

Aus dem Institut
für klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin
im Klinikum Steglitz

Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Dulce

ÜBER DEN MEMBRANTRANSPORT BEI MAGNESIUM-ARM GEWACHSENEN TUMORZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Boris Georg Ostapowicz aus Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut
für klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin
im Klinikum Steglitz

Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Dulce

ÜBER DEN MEMBRANTRANSPORT BEI MAGNESIUM-ARM GEWACHSENEN TUMORZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von Boris Georg Ostapowicz aus Berlin

Referent: Priv.-Doz.Dr.med.R.Averdunk

Korreferent: Prof.Dr.med.Th.Günther

Promotionstag: 25.8.1976



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

INHALTSÜBERSICHT

SEITE

1.	EINFÜHRUNG mit Aufgabenstellung der Arbeit	4
2.	MATERIAL und METHODEN	
2.1.	Material	8
2.2.	Methoden	
2.2.1.	Isolieren, Zählen u. Einsetzen d. Zellen i. d. Kultur	8
2.2.2.	Zellzüchtung	8
2.2.3.	Vorbereitung d. Zellen f. d. Transportversuche	9
2.2.4.	Bestimmung der Aminosäure- und Zuckeraufnahme	10
2.2.5.	" " " " " abgabe	11
2.2.6.	" des Na^+ -Effluxes	11
2.2.7.	" der (^3H)Ouabain-Bindung	11
2.2.8.	" des zellulären Kationengehaltes	12
2.2.9.	" " " Ado-3':5'-P-gehaltes	12
2.2.10.	Proteinbestimmung	12
2.2.11.	Bestimm. d. intrazell. Wassers sowie des im Sediment interzell. eingeschlossenen Wassers (eW)	12
3.	BERECHNUNGEN	
3.1.	Ber. d. intrazell. ABS- und MGP-Konzentration	15
3.2.	" " " " " Anreicherung	15
3.3.	" " $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux-Geschwindigkeitskonstante	16
3.4.	" " Ouabainbindungsstellen pro Zelle	17
3.5.	" statistischer Größen	17
3.6.	Statist. Vergleich zweier Regressionskoeffizienten	18
4.	ERGEBNISSE	
4.1.	ABS- und MGP-Aufnahme in Yoshida-Tumorzellen	21
4.2.	Transport nach Wachstum unter Magnesiummangel	26
4.3.	Einfluß von Ado-3':5'-P auf den Kationengehalt bei Yoshida-Tumorzellen	32
5.	DISKUSSION	
	Transportsystem	34
	Transport nach Wachstum unter Magnesiummangel	39
6.	ZUSAMMENFASSUNG	47

ANHANG

Literaturverzeichnis	48
----------------------	----

BASIC-Programm	56
----------------	----

HP 65 - Programme	68
-------------------	----

ABKÜRZUNGEN

ABS	γ -Aminobuttersäure
Ado-3':5'-P	Zyklisches Adenosin-3':5'-Monophosphat
AIB	α -Aminoisobuttersäure
CAMP	s. Ado-3':5'-P
DibutyrylCAMP	N ⁶ -2'-O-dibutyryl-ado-3':5'-P
Eagle MEM	Minimal essential medium, Kulturmedium n.Eagle
MGP	α -Methyl-D-Gluko-Pyranosid
KRP	Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, mod.n.Schafer
PBS 7	Phosphat buffer solution , pH 7
RPMI 1640	Kulturmedium nach Moore
SA	Spezifische Aktivität radioaktiver Isotopen
TCE	Tri-Chlor-Essigsäure
(X) _{i,e}	Konzentration eines Stoffes X ; Index i bzw. e für intra- bzw. extrazellulär

1. EINFÜHRUNG

Ein erwachsener Mensch benötigt eine tägliche Zufuhr von 10 - 25, ein älteres Kind 8 - 12 und ein Kind unter 10 Jahren ca. 6 mmol Magnesium. Davon werden nur ca. 30 % resorbiert (HOLTMEIER 1968).

Der Normbereich für Magnesium im menschlichen Serum beträgt 0.8 - 1 mmol/l. Ein Drittel des Serum-Magnesiums ist protein-gebunden, die Hälfte frei ionisiert und der Rest liegt als Chelatkomplexe vor (WALSER 1971).

Die intrazelluläre Magnesiumkonzentration liegt im Erythrozyten bei 4, in der Muskelzelle bei 13 mmol/l Zellwasser, und steht damit nach Kalium an zweiter Stelle der intrazellulären Kationenkonzentrationen (HÄNZE 1962). Intrazellulär ist Magnesium vorwiegend an Proteine und Phosphatverbindungen wie ATP gebunden (HÄNZE 1962). Magnesium ist an wichtigen Zellfunktionen beteiligt, wie Protein-, DNS- und RNS-Synthese, Ribosomaufbau (WEBB 1970), Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien, überhaupt an allen ATP bildenden und verbrauchenden Reaktionen, außerdem an der synaptischen Übertragung der Nerven-erregung u.a. mehr (Übersicht bei AIKAWA 1971 und WACKER 1969).

Die physiologische Regulierung des Magnesiumstoffwechsels ist noch nicht genügend geklärt. Nach bisheriger Kenntnis könnte eine dem Ca^{++} z.T. ähnliche Regelung durch die Nebenschilddrüse vorliegen (HÄNZE 1962, MASSRY 1970, ZUMKLEY 1971, WALLING 1975).

Beim Menschen tritt ein isolierter Magnesiummangel nur selten auf; das klinische Bild ist daher von Symptomen anderer Erkrankungen überlagert (HÄNZE 1962).

HOLTMEIER (1968) schlug eine Einteilung in ein primäres und ein sekundäres Magnesiummangelsyndrom vor. Zum primären Mangelsyndrom führt ein vermindertes Magnesiumangebot, z.B. calcium- oder proteinreiche Kost. Zum sekundären Mangelsyndrom kommt es infolge anderer Krankheiten, z.B. bei Hyper-

parathyreoidismus, und vor allem durch Alkoholabusus , aber auch iatrogen durch Diuretica (HOLTMEIER 1968 u.1971,BATTI-FORA 1971, FISCHBACH 1971, WHANG 1971, ZUMKLEY 1971).

Schon 1932 konnte Magnesiummangel bei Ratten mit einem reproduzierbaren Symptomenbild erzeugt werden (KRUSE 1932) : Nach ca. 4 Tagen Hauterythem und Hyperämie,nach ca.16 Tagen Blässe, Zyanose und gesteigerte neuromuskuläre Erregbarkeit; wenn nicht Tod unter generalisierten Krampfanfällen eintritt, kommt es zu Alopezie, trophischen Hautstörungen, Ohrenhämatomen und Schwellungen des Gaumens.

In jüngerer Zeit wurden in Tierversuchen Veränderungen im Enzymmuster und Kationen Gehalt der Zellen (GÜNTHER 1970 a,b) sowie Konzentrationsänderungen der freien Fettsäuren , der Albumine und der Immunglobuline im Serum (SCHMALBECK et al. 1972 a,b ,ELIN 1975) beobachtet. Die stärksten Veränderungen zeigten sich in Geweben mit starker sympathischer Innervation, d.h. mit starker Noradrenalin ausschüttung (GÜNTHER et al. 1972/73).

Der Wirkungsmechanismus des Magnesiummangels auf zellulärer Ebene ist bisher noch nicht geklärt.Parallel zuden in vivo-Versuchen wurde daher durch in vitro-Versuche der Magnesiummangel weiter untersucht.Isolierte Zellsysteme,z.B. Suspensionskulturen, haben den Vorteil der besseren Manipulierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Magnesiummangelbedingungen. Außerdem entfallen die oben angesprochenen physiologischen gegenregulierenden Einflüsse durch Innervation und Hormone. In magnesiumarm gewachsenen Bakterien und Tumorzellkulturen konnten als Hauptveränderungen ein ausgeprägter intrazellulärer Kaliumverlust durch erhöhten Kaliumefflux und eine intrazelluläre Natriumzunahme nachgewiesen werden (GÜNTHER et al. 1968, 1970).

Mit dem transmembranösen Ionentransport beeinträchtigt der Magnesiummangel eine wichtige Zellfunktion.Transportvorgänge sind zur Behauptung der Zelle in ihrer Umgebung unentbehrlich, da Zellen in thermodynamischer Hinsicht offene Systeme sind (KLIMA 1967). Dabei hat die Zellmembran hauptsächlich zwei Funktionen zu erfüllen:

1. Eine Trennfunktion: Bewahrung lebensnotwendiger Stoffe im Zellinneren, Schutz vor zellschädigenden Stoffen in der Zellumgebung.
2. Eine Transportfunktion: Aufnahme energieliefernder und essentieller Stoffe unabhängig von ihrer Außenkonzentration, Abgabe der Zellstoffwechselabfälle.

Das erste wird hauptsächlich durch die bimolekulare Lipoid - schicht der Zellmembran gewährleistet (DANIELLI et al. 1952, ROBERTSON 1962). Das zweite wird durch Transportsysteme mit z.T. enzymähnlich hoher Substratspezifität erfüllt.

Man unterscheidet dabei zwischen passivem und aktivem Transport:

PASSIVER TRANSPORT wird die Diffusion eines Transportsubstrates durch die Membran in Richtung seines Konzentrationsgefälles genannt.

Der passive Transport kann weiter unterteilt werden in:

- a. "Freie" Diffusion: Geringer Anteil am zellulären Transport.
- b. "Erleichterte" Diffusion (Carriertransport, Teilphänomen: Beschleunigender Gegentransport (counter flow, preloading effect)): Wichtige Transportart für Zucker, vermutlich Nukleoside (MIZEL 1972), einige Aminosäuren in Bakterien (RING 1970) und viele größere lipidunlösliche Moleküle.

AKTIVER TRANSPORT wird die Bewegung eines Transportsubstrates durch die Membran gegen sein Konzentrationsgefälle mit Hilfe chemischer Energie aus dem Zellstoffwechsel genannt (BROWN 1966, WOODBURY 1966).

Natrium, Kalium (Na^+ - K^+ -Pumpe), weitere Ionen und Aminosäuren werden aktiv transportiert. Die Na^+ - K^+ -Pumpe verbraucht dabei mindestens 10 - 20 % der Zellenergie (MAIZEL et al. 1958, WOODBURY 1966). Zur Energiegewinnung wird Adenosintriphosphat (ATP) durch die membrangebundene magnesiumabhängige Na^+ - K^+ -ATPase hydrolysiert. Der Aminosäuretransport soll unter bestimmten Bedingungen bis zu 50 % des zellulären ATP verbrauchen (JOHNSTONE 1965).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob im Magnesium -
mangel weitere Veränderungen des Membrantransportes vorlie-
gen. Dazu wird der Transport zweier kleiner Moleküle gemes-
sen. Wegen der erwähnten Vorteile werden isoliert wachsende
Yoshida-Ascites-Tumor-Zellen in magnesiumarmen Suspensions-
kulturen gezüchtet und für die Untersuchungen verwendet.

Der erste Abschnitt der Arbeit befaßt sich mit den allgemei-
nen Eigenschaften des bisher an diesen Zellen noch nicht un-
tersuchten Aminosäure- und Zuckertransportes. Als Substrate
werden die nicht verstoffwechselbaren ^{14}C - γ -Aminobuttersäure
und ^{14}C - α -Methyl-D-glukopyranosid verwendet.

Im zweiten Abschnitt wird der aktive Natrium-, Aminosäure -
und Zuckertransport bei magnesiumarm gewachsenen Zellen un-
tersucht.

Darüberhinaus soll untersucht werden, wie die erwähnten Kat-
ionenveränderungen im Magnesiummangel verursacht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

^{14}C - γ -Aminobuttersäure (SA 3.22 mCi/mmol) und ^{22}Na (SA 1.61 Ci/mmol) wurden von NEN Chemicals , Boston , USA , ^{14}C - α -Methyl-D-Gluko-Pyranosid (SA 3.8 mCi/mmol) und ^{14}C -Hydroxy-Inulin (SA 9.5 mCi/mmol) von "The Radio Chemical Center", Amersham-Buchler, England, die Kulturmedien (Eagle MEM, RPMI 1640) von Biocult, Glasgow, England bezogen. Die Salzlösungen der magnesiumarmen Kulturen wurden analog zusammengesetzt und sterilfiltriert; MgCl_2 wurde dabei durch eine äquivalente Menge NaCl ersetzt. Foetales Kälberserum war von Serva, Heidelberg; das normale Kälberserum wurde gegen PBS 7 (NaCl 140.2, KCl 5.4, KH_2PO_4 2.2, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 9.9 mmol/l) magnesiumfrei dialysiert, steril-filtriert und bei 56°C inaktiviert.

Die Yoshida-Mäuse-Ascites-Tumorzellen wurden wöchentlich auf erwachsene weibliche weiße Mäuse des Stammes CF 1 intra-peritoneal überimpft.

2.2 METHODEN

2.2.1. Isolieren, Zählen und Einsetzen der Zellen in die Kultur

Nach 5 - 6 Tagen intraperitonealem Tumorwachstum wurde die Ascitesflüssigkeit mit einer heparinisierten Einmal-Spritze unter Spülen in magnesiumfreiem Eagle-Medium aufgenommen . Das Punktat enthielt durchschnittlich $3 - 5 \cdot 10^8$ Zellen. Die Zellzählung wurde aus 0.5 ml einer 1 : 500 - Verdünnung mit dem Coulter Counter Model B durchgeführt und die Zellkonzentration am Beginn der Zellzüchtung auf ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

2.2.2. Zellzüchtung

Die Yoshida-Zellen wurden 6 Tage in Suspensionskulturen gezüchtet (AVERDUNK et al.1968). Als Gefäße dienten Rundkolben mit Planschliffdeckel der Fa.Quickfit, Wiesbaden, mit einem

Volumen von 0.25 - 2 l. Die Zellen wurden durch einen Anker - rührer mit einer Rührgeschwindigkeit von 40 Upm in Suspension gehalten. Die Zellkonzentration wurde täglich aus einer 1:50-Verdünnung bestimmt. Als Kulturmedium wurde Eagle MEM (EAGLE 1959) bzw. RPMI 1640 (MOORE et al. 1967) mit Eagle-MEM-Salzen verwendet, dem 10 % magnesiumfrei dialysiertes Kälberserum und 5 % foetales Kälberserum zugesetzt wurden. Die NaHCO_3 - Konzentration des Kulturmediums wurde mit 7.5 %iger NaHCO_3 - Lösung auf ca. 30 mmol/l gebracht; zur pH-Einstellung wurden die Kulturen ständig mit einem Pressluft- CO_2 -Gemisch von 95:5 belüftet. Die Kulturen wuchsen bei 37°C. Die Magnesiumkonzentration betrug im normalen Kontrollmedium 1.2 mmol/l und im magnesiumarmen Medium 0.18 mmol/l.

Nach dreitägigem Wachstum wurden die Zellen abzentrifugiert (200 ml-Gefäße, 4°C, 800 g, 30 min) und in frischem Medium mit einer Zellkonzentration von $2 - 3 \cdot 10^5$ Zellen/ml weitergezüchtet. Durch dieses Vorgehen blieb die Zellkonzentration während des Wachstums stets unter 10^6 Zellen/ml.

2.2.3. Vorbereitung der Zellen für die Transportversuche

Die Suspensionskulturen wurden durch vierfach gelegten Mull filtriert, um größere Eiweißflocken zu entfernen. Aus dem Filtrat wurden die Zellen abzentrifugiert (200 ml-Gefäße, 4°C, 200 g, 10 min) und dreimal in KRP (s.u.) gewaschen (40 ml - Gefäße, 4°C, 200 g, 10 min). Nach der Zellzählung (siehe 2.2.1.) wurde der Anteil abgestorbener Zellen mikroskopisch bestimmt (KISSMEYER-NILSON 1967). Dazu wurden drei Nativ - präparate nebeneinander auf einem Objektträger hergestellt (jeweils 1 Tropfen Zellsuspension und 4 Tropfen Trypanblau - lösung (1 %ig in 0.15 molarer NaCl-Lsg.) mischen und mit einem Deckglas versehen) und 30 min später an jeweils 200 Zellen der Anteil blauer (d.h. abgestorbener Zellen) ausgezählt. Dieser Anteil geht als Faktor (F1) in die Berechnung der intrazellulären Konzentrationen ein.

2.2.4. Bestimmung der Aminosäure- und Zuckeraufnahme

Die Versuche wurden in 25 ml-Rundkolben bei 37°C durchgeführt.

führt. Die Zellkonzentration betrug mindestens $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Als Medium diente ein modifizierter (SCHAFFER 1967) Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (KRP) mit pH 7 und einer Osmolalität von 275 mosmol/kg (NaCl 118.4, KCl 4.73, CaCl_2 0.84, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1.17, KH_2PO_4 1.17, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.44, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 14.15 mmol/l). Bei länger als zwei Stunden dauernden Versuchen wurde 1 mmol/l neutralisiertes Na-Pyruvat als Nährsubstrat zugesetzt.

Mit der Zugabe der markierten Substanzen wurden die Versuche gestartet. Die Konzentrationen von ABS und MGP im Medium betrugen bei der ABS 0.1 mmol/l und beim MGP 1 mmol/l. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Dreifachproben von je 1 ml entnommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt und die Zellen auf einer Ecco-Tischzentrifuge (6700 g, 20 sec.) vom Medium getrennt. Der Überstand wurde zur ^{14}C -Messung dekantiert und durch vorsichtiges Absaugen und Austupfen vollständig entfernt. Das Sedimentfeuchtgewicht wurde sofort, das Trockengewicht nach Gefriertrocknung (CHRIST bzw. HERÄUS, 24 h) bestimmt.

Die Zellsedimente wurden mit 0.05 ml 100 %iger TCE aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0.45 ml Aqua tridest. wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert (Ecco-Tischzentrifuge, 14000 g, 2 min), die TCE ausgeäthert und 0.1 ml des Rückstandes ebenso wie 0.1 ml des dekantierten (s.ob.) Überstandes zur Messung der ^{14}C -Aktivität mit je 10 ml Dioxan-Szintillationsflüssigkeit* gemischt. Die ^{14}C -Aktivität wurde im Beckman-Szintillationsspektrophotometer LS 100 jeweils 10 min lang gemessen.

Als Bezugsgröße der intrazellulären Konzentration diente das intrazelluläre Wasser (Bestimmung siehe 2.2.11.).

* Zusammensetzung der Dioxan-Szintillationsflüssigkeit:

1. 250 mg POPOP = 2,2'-p-Phenyl-bis-(5-phenyloxazol)
2. 20 g PPO = 2,5-Diphenyloxazol

3. 600 g Naphthalin

1. und 2. zusammen in 2 l, 3. gesondert in ebenfalls 2 l Dioxan lösen, zusammen gießen und auf 5 l auffüllen.

2.2.5. Bestimmung der Aminosäure- und Zuckerabgabe

Außere Bedingungen wie unter 2.2.4. beschrieben. Die Zellen wurden 60 min in KRP mit 0.2 mmol/l markierter ABS bzw. mit 2 mmol/l markiertem MGP beladen, danach abzentrifugiert (40ml-Gefäße, 200 g, 10 min, Zimmertemp.) und in vorgewärmtem, nuklidfreiem KRP resuspendiert. Letzteres galt als Startzeit der Abgabe. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Aufnahmeversuche.

2.2.6. Versuchsanordnung zur Bestimmung des Na^+ -Effluxes

Außere Bedingungen wie unter 2.2.4. beschrieben. Als Medium diente Eagle MEM mit 5 % foetalem Kälberserum. Nach 60 min Vorinkubation mit 20 μCi $^{22}\text{Na}/\text{ml}$ wurden die Zellen zweimal mit nuklidfreiem, gekühltem Eagle-Medium gewaschen und bei 37°C in einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in den Versuchsansatz eingesetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Doppelproben von je 0.5 ml entnommen, zentrifugiert (siehe 2.2.4.) und im gesamten Zellsediment sowie im Überstand die ^{22}Na -Aktivität im Packard-Autogammazähler gemessen.

2.2.7. Bestimmung der (^3H)Ouabain-Bindung

Außere Bedingungen wie unter 2.2.6. beschrieben. Jeder Versuchsansatz enthielt $5 \cdot 10^6$ Zellen und 100 nmol (^3H)Ouabain/l. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten abzentrifugiert (siehe 2.2.4.), dreimal mit eiskalter 0.15 mol/l NaCl-Lösung gewaschen, in 0.5 ml 10 mmol/l NaOH aufgelöst und quantitativ in 10 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen. Nach 6 Stunden Stehen im Dunkeln zur Vermeidung der Chemofluoreszenz wurde die ^3H -Aktivität im Beckman LS 100 gemessen.

Zur Bestimmung des unspezifischen Anteils der Ouabain-Bindung wurden die Zellen mit 10^3 nmol/l unmarkiertem Ouabain 10 min vorinkubiert und für eine weitere Inkubation von 60 min dem Ansatz ^3H -markiertes Ouabain zugesetzt (100 nmol/l im Ansatz). Dann wurden die Zellen wie beschrieben aufgeschlossen und die - unspezifische - ^3H -Aktivität gemessen.

2.2.8. Bestimmung des zellulären Kationengehaltes

Die Zellen wurden vom Kulturmedium getrennt (siehe 2.2.3.) und zweimal mit 0.1 molarer $MgCl_2$ -Lösung gewaschen, gewogen und mit TCE aufgeschlossen. Im TCE-Überstand wurden Natrium und Kalium mit dem Flammenphotometer Mod. 143 von IL, Lexington, Mass./USA, gemessen.

Zur Bestimmung des Magnesium- und Calciumgehaltes diente als Waschlösung 0.15 molare NaCl-Lsg. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren. Magnesium und Calcium wurden im Atomabsorptionsspektrophotometer Mod. 301 von Perkin Elmer, Bodenseewerk, gemessen (WILLIS 1960).

2.2.9. Bestimmung des zellulären Gehaltes an zyklischem Adenosin-3'5'-Monophosphat

Es wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen mit 0.1 %igem Triton-X-100 aufgeschlossen und mit dem Test-Kit der Fa. Boehringer, Mannheim, bestimmt. Als Bezugsgröße wurde das Zellprotein bestimmt.

2.2.10. Proteinbestimmung

Die Zellen wurden mit 0.1 molarer NaOH aufgelöst. Die Proteinbestimmung wurde nach der Biuretmethode durchgeführt (WEICHSELBAUM 1946).

2.2.11. Bestimmung des intrazellulären Wassers sowie des im Sediment zwischen den Zellen eingeschlossenen Extrazellulärwassers (eW)

Das Gesamtsedimentwasser wurde aus der Differenz zwischen Trocken- und Feuchtgewicht des Sedimentes erhalten. Es setzt sich aus dem intrazellulären und dem zwischen den Zellen eingeschlossenen extrazellulärem Wasser (eW, engl.: Trapped volume) zusammen. Das eW wurde mit ^{14}C -Inulin bestimmt. Dazu wurden folgende Voraussetzungen angenommen: Inulin verteilt sich im extrazellulären Wasser und im Zellulärwasser abgestorbener Zellen gleichmäßig; intakte Zellen nehmen

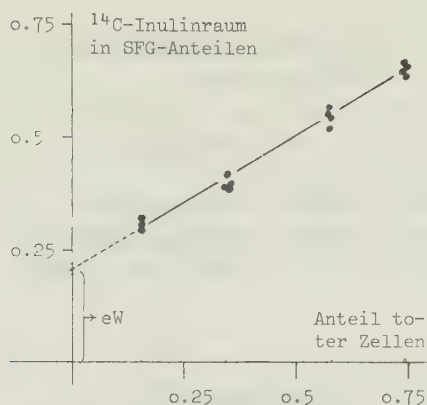


Abb. 1 Bestimmung des eW (s.Text) aus dem ^{14}C -Inulinraum. - Der steigende Anteil toter (trypanblauer) Zellen wurde durch Zumischen einer Zellsuspension erreicht, die in Eppendorf-Reaktionsgef. 1-2 min auf 60°C erhitzt u. sofort im Eisbad gekühlt wurde. Werte der Regressionsgeraden $y = a + bx$:
 $a = 0.205 \pm 0.011$ SFG-Anteile = eW,
 $b = 0.596 \pm 0.021$ SFG-Ant./Ant.toter Z.,
 Korrelat.koeff. $r \pm s_r = 0.992 \pm 0.035$.
 (SFG = Sedimentfeuchtgewicht)

Inulin nicht auf.

Ein steigender Anteil toter Zellen wurde gegen den ^{14}C -Inulinraum des Sedimentes in Gewichtsanteilen des Sediment - feuchtgewichtes aufgetragen und durch Extrapolation der Regressionsgerade auf Null Anteile toter Zellen das eW als Ordinatenabschnitt a erhalten (siehe Abb. 1). Das eW betrug 0.205 ± 0.011 Gewichtsanteile des Sedimentfeuchtgewichtes. Zum Vergleich siehe Tab. 1.

Als Bezugsgröße der intrazellulären Substratkonzentration wurde das intrazelluläre Wasser, ausgedrückt als Gewichtsanteil des Sedimentfeuchtgewichtes (F2), aus dem Sediment - wasser nach Abzug des eW und des Zellwassers toter Zellen errechnet. Dafür wurde das eW als konstanter Faktor (F3) und das Zellwasser toter Zellen als variabler Faktor - abhängig vom Anteil toter Zellen (F1) - berücksichtigt.

TAB. 1 Anteil des "trapped volume" am Sedimentfeuchtgewicht bei verschiedenen Zellen. (e = experimentell, r = rechnerisch)

ZELLART	"trapped volume"		LITERATUR
Yoshidatumorzellen	e 21	(w/w) %	Diese Arbeit
Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen	e 16	(v/v) %	HEINZ u. MARIANI 1957
Leukozyten, human	e 20	"	THOM 1972, mündl. Mitt.
Erythrozyten, "	e 1-2	"	"
Kugeln, starr, hexagonale Lagerung	r 26	"	"
" " kubische "	r 48	"	"
Nierenrindenstückchen	e 26	(w/w) %	SEGAL 1967
"	e 25	(v/w) %	KLEINZELLER 1967 b

3. BERECHNUNGEN

3.1. Berechnung der intrazellulären ABS- und MGP-Konzentrationen

Die Berechnung der intrazellulären Konzentrationen $(S)_i$ von ^{14}C - γ -ABS und ^{14}C - α -MGP erfolgte nach dem Prinzip von SEGAL (1967), geringfügig modifiziert, s. Gleichung (1a):

$$(1) \quad (S)_i = \frac{\text{Cpm}}{\mu\text{l IZR}}$$

$$(1a) \quad (S)_i = \frac{\text{Cpm}_{\text{Gesamtsediment}} - (\text{Cpm}_{\text{eW}} + \text{Cpm}_{\text{IZR abgestorbener Zellen}})}{\mu\text{l Sedimentwasser} - (\mu\text{l eW} + \mu\text{l IZR abgestorbener Zellen})}$$

wobei Cpm, IZR und eW die Counts per min als Nettomeßeffect der ^{14}C -Aktivität, das Intrazellulärwasser und das zwischen den Zellen im Sediment eingeschlossene Extrazellulärwasser sind.

Sedimentwasser, eW und IZR wurden in die Gleichung als Gewichtanteil des Sedimentfeuchtgewichtes eingesetzt. Dabei wurde der Volumenverlust der TCE beim Ausäthern, sowie die spezifische Dichte der 10%igen TCE-Lösung berücksichtigt.

Nicht gemessen oder berücksichtigt wurde, ob die Zellen durch osmotische Wirkung mit dem Substrat auch Wasser aufnehmen, wie zB. für β -Alanin beschrieben (KROMPHARDT 1963a).

Zur Umrechnung der Cpm in nCi bzw. nmol/l wurde mit in KRP gelöster ^{14}C - γ -ABS eine Eichkurve von 0.1 bis 500 nCi erstellt und mit einem Beckman- ^{14}C -Standard verglichen, der bei allen Versuchen mitgemessen wurde. Der Quench von KRP war nicht größer als der von H_2O ; die Zählausbeute betrug beim Beckman LS 100 ca. 75 %, beim Packard-Tricarb ca. 90 %.

3.2. Berechnung der intrazellulären ABS- und MGP-Anreicherung

Die Berechnung der intrazellulären Substratanreicherung erfolgte nach Gleichung (2a):

$$(2) \quad R = \frac{(S)_i}{(S)_e} = \frac{C_{pm} \cdot \mu l \text{ EZR}}{\mu l \text{ IZR} \cdot C_{pm}}$$

wobei R die Rate der Anreicherung, $(S)_i$ die intrazelluläre, $(S)_e$ die extrazelluläre Substratkonzentration und IZR das intrazelluläre, EZR das extrazelluläre Wasser bedeuten. Nach Berücksichtigung der unter 3.1. genannten Faktoren ergibt sich für R folgende Gleichung:

$$(2a) \quad R = \frac{F4 \cdot \frac{(C1-B1)}{(C2-B2)} \cdot \left(\frac{T}{C3 \cdot K1} + K2 + 1 \right) - F1 - K2}{1 - F1}$$

In sie können die Messdaten direkt eingesetzt werden ($C1 = C_{pm}^{\text{Sediment}}$, $C2 = C_{pm}^{\text{Überstand}}$, $B1$ u. $B2 =$ Nulleffekt, $C3 =$ mg Sedimentfeuchtgewicht, $T = \mu l$ TCE-Volumen, $F1 =$ Zählanteil abgestorbener Zellen).

Für die Errechnung von $R, (S)_i, (S)_e$ sowie statistischer Daten, einschließlich der Transportgeschwindigkeit v , wurde ein Programm in BASIC für den Computer 2100 A der Fa. Hewlett-Packard, Cupertino, Calif., USA, erstellt.

Programm und ein Beispiel zur Berechnung eines Versuches s. Anhang. Die Messdaten konnten wahlweise über Lochstreifen oder direkt eingegeben werden.

3.3. Berechnung der Geschwindigkeitskonstante des ^{22}Na -Effluxes

Unter der Annahme, daß die Zelle beim Na^+ -Austausch als ein einheitliches Kompartiment anzusehen ist, kann als Geschwindigkeitsmaß des Na-Effluxes nach AVERDUNK u. LAUF 1975 eine Konstante berechnet werden:

$$(3) \quad k_1 = \frac{\ln(1 - \frac{A_t}{A_o})}{t} \quad \text{aus} \quad A_t = A_o(1 - e^{-k_1 t})$$

Die Version (3A) nach RADCLIFFE 1974 hat gegenüber Gl. (3) jedoch den praktischen Vorteil, daß die Geschwindigkeitskonstante k der Effluxgeschwindigkeit direkt proportional ist. Sie wurde daher hier angewendet:

$$(3A) \quad k = \frac{\ln\left(\frac{A_t}{A_o}\right)}{t} \quad \text{aus} \quad A_t = A_o \cdot e^{k \cdot t}$$

wobei für A_t die restliche intrazelluläre ^{22}Na -Aktivität zur Zeit $t=0.17 \text{ h}$ ($=10 \text{ min}$), für A_o die ^{22}Na -Gesamtaktivität zur Zeit $t=0 \text{ h}$ und für t die A_t entsprechende Inkubationszeit in h einzusetzen ist.

3.4. Berechnung der Ouabainbindungsstellen pro Zelle

Die Berechnung der Ouabainbindungsstellen pro Zelle (OBS) erfolgte nach dem von AVERDUNK u. LAUF 1975 angegebenen Prinzip:

$$(4) \quad \text{OBS} = \frac{\text{gebundene Ouabainmoleküle}}{\text{Zelle}}$$

Die Anzahl der Moleküle erhält man aus der gemessenen ^3H -Aktivität, der spez. Aktivität und der Loschmidtschen Zahl.

Durch Einsetzen der entsprechenden Größen, Berücksichtigung der Zählausbeute der Aktivitätsmessung entsteht Gl. (4a), in die die Messgrößen (C u. Z) direkt eingesetzt werden können:

$$(4a) \quad \text{OBS} = \frac{C \cdot L}{e \cdot \text{SA} \cdot k \cdot Z}$$

wobei C = gemessener ^3H -Nettoeffekt/Ansatz in Cpm

L = Loschmidtsche Zahl = $6.02 \cdot 10^{23}$ Moleküle/mol

e = Zählausbeute = gemessene Standard-Cpm/Stand.-dpm-Angabe

SA = Spez. ^3H -Ouabainaktivität in Ci/mol laut Fa.angabe

k = Umrechnungsfaktor Ci $\rightarrow$ dpm = $2.22 \cdot 10^{12}$

Z = gemessene Zellzahl/Ansatz

bedeuten.

3.5. Berechnung statistischer Größen

Die verwendeten statistischen Gleichungen wurden den Monographien von FUCHS (1969) oder SACHS (1974) entnommen. Ihre Berechnung erfolgte als Unterprogramm in dem unter 3.2. erwähnten Programm oder mit dem programmierbaren Taschenrechner HP 65 der Fa. Hewlett-Packard. Die erstellten Programme

sind mit Bedienungsanleitung im Anhang aufgeführt.
Folgende Gleichungen wurden verwendet:

$$\begin{aligned}\text{Mittelwert:} \quad \bar{x} &= \frac{\sum x}{n} \\ \text{Standardabweichung:} \quad s &= \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2 / (n - 1)}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}{n - 1}} \\ \text{Variationskoeffizient: VK\%} &= \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \\ \text{Regressionsgerade:} \quad y &= a + b \cdot x\end{aligned}$$

Für die Regression von y auf x, dh. x sei eine feste vorgegebene Größe und y die abhängige variable Antwortgröße, gelten die folgenden Schätzgleichungen:

Standardabweichung der $\hat{y}$ -Werte auf der Regressionsgerade für ein gegebenes x ist $s_{y \cdot x}$. Zwei Parallelen zur Regressionsgerade im Abstand von $2s_{y \cdot x}$ in y-Richtung schließen 95 % aller beobachteten Werte zwischen sich ein:

$$s_{y \cdot x} = \sqrt{\frac{Q_y - Q_{xy}^2 / Q_x}{n - 2}}$$

$$\text{Regressionskoeffiz.: } b_{yx} = Q_{xy} / Q_x$$

$$\text{Standardabw. des " : } s_{b_{yx}} = s_{y \cdot x} / \sqrt{Q_x}$$

$$\text{Achsenabschnitt : } a_{yx} = \bar{y} - b_{yx} \cdot \bar{x}$$

$$\text{Standardabw. des " : } s_{a_{yx}} = s_{y \cdot x} \sqrt{1/n + \bar{x}^2 / Q_x} = s_{b_{yx}} \sqrt{\sum x^2 / n}$$

$$\text{dabei sind: } Q_x = \sum x^2 - (\sum x)^2 / n$$

$$Q_y = \sum y^2 - (\sum y)^2 / n$$

$$Q_{xy} = \sum xy - \sum x \sum y / n$$

Für die Regression von x auf y müssen in den Gleichungen $\bar{y}$ mit $\bar{x}$, Q_x mit Q_y -abgeleitete Größen sinngemäß- vertauscht werden, zB.

$$s_{b_{xy}} = s_{x \cdot y} / \sqrt{Q_y}$$

Je näher das geometrische Mittel der Steigungen beider Regressionsgeraden, das ist der

Korrelationskoeffiz.: $r = Q_{xy} / \sqrt{Q_x \cdot Q_y}$, an ± 1 herankommt, desto größer ist der formale lineare Zusammenhang zwischen x und y.

$$\text{Standardabw. des Korrelationskoeff.: } s_r = \sqrt{(1 - r^2) / (n - 2)}$$

3.6. Statistischer Vergleich zweier Regressionskoeffizienten

Der Vergleich zweier Regressionskoeffizienten, dh. zweier Transportgeschwindigkeiten (s. 4.1.1.), wurde nach dem von SACHS 1974

auf S.341 angegebenen Schema durchgeführt und die zugehörigen Rechnungen mit einem HP-65-Programm ausgeführt.

Vergleichsschema:

- A. Entscheidung ob $\sigma_{y_1 \cdot x_1} = \sigma_{y_2 \cdot x_2}$ oder ungleich,
da hiervon die Wahl der Gleichung der kombinierten Standardabweichung s_D zur Student-Prüfgleichung abhängt;

Testverfahren: $\hat{F} = \frac{s_1^2 \cdot y_1 \cdot x_1}{s_2^2 \cdot y_2 \cdot x_2}$ wobei $s_1^2 > s_2^2$! (SACHS, S.115/116)

Vergleich mit F-Verteilungstabellenwert auf dem 10 % Niveau:

wenn 1. $\hat{F} \leq F_{(n_1-2; n_2-2; 0.1)} \Rightarrow$ Restvarianzen gleich,

wenn 2. $\hat{F} > F_{(n_1-2; n_2-2; 0.1)} \Rightarrow$ " ungleich.

Zu 1. Gl. (1)
$$s_D = \sqrt{\frac{s_1^2 \cdot y_1 \cdot x_1 (n_1 - 2) + s_2^2 \cdot y_2 \cdot x_2 (n_2 - 2)}{n_1 + n_2 - 4} \left(\frac{1}{Q_{x_1}} + \frac{1}{Q_{x_2}} \right)}$$

$$v = n_1 + n_2 - 4$$

Zu 2. , a. wenn n_1 und $n_2 > 20$

Gl. (2)
$$s_D = \sqrt{\frac{s_1^2}{Q_{x_1}} + \frac{s_2^2}{Q_{x_2}}} \quad v \text{ wird nicht bestimmt}$$

und der Vergleich mit den Schranken der Standnormal-

verteilung durchgeführt, $\hat{z} = \frac{|b_1 - b_2|}{s_D}$ (SACHS, S.172)

b. wenn n_1 und $n_2 < 20$ (SACHS, S.342)

(3) $s_D =$ wie bei (1),

aber
$$v = \frac{1}{\frac{c^2}{n_1 - 2} + \frac{(1-c)^2}{n_2 - 2}} \quad \text{wobei } c = \frac{\frac{s_1^2}{Q_{x_1}}}{\frac{s_1^2}{Q_{x_1}} + \frac{s_2^2}{Q_{x_2}}} = \frac{\frac{s_1^2}{Q_{x_1}}}{s_D^2}$$

B. Entsprechendes s_D in die Student-Prüfgleichung einsetzen:

$$\hat{t}_{v, \alpha} = \frac{D - \Delta}{s_D} \quad \text{dabei sind } D = |b_1 - b_2|$$

$$\Delta = |\beta_1 - \beta_2|$$

Für die Nullhypothese $\beta_1 = \beta_2$, dh. $\Delta = |\beta_1 - \beta_2| = 0$ ist mit der Wahrscheinlichkeit α trotzdem ein $D \neq 0$ zu erwarten.

Prüfgleichung
$$\hat{t}_{v, \alpha} = \frac{D}{s_D} = \frac{|b_{y_1 x_1} - b_{y_2 x_2}|}{s_D}$$

C. Beurteilung:

1. Einseitige Fragestellung mit der Alternativhypothese: $\beta_1 > \beta_2$
2. Zwei " " " " " : $\beta_1 \neq \beta_2$

Festlegung der Signifikanzschranke α_G (zB. 0.05), die die Wahrscheinlichkeit angibt, irrtümlich eine Signifikanz anzunehmen (FUCHS 1969, S.164), ein Fehler erster Art.

P gibt die Wahrscheinlichkeit an mit der trotz Nullhypothese die gemessene Differenz zwischen b_1 und b_2 auftreten kann. ($P = \alpha$)

Praktisches Vorgehen:

In der t-Testtabelle in Zeile ν bis Spalte α_G gehen, und gefundenes t_{α_G} mit errechnetem $\hat{t}_\alpha$ vergleichen:

$$\begin{array}{ll} \hat{t}_\alpha \geq t_{\alpha_G} & \text{Nullhypothese abgelehnt, dh. } P \leq \alpha_G \\ \hat{t}_\alpha < t_{\alpha_G} & \text{" nicht " , " } P > \alpha_G \end{array}$$

Nullhypothese abgelehnt heißt, daß die Alternativhypothese für wahrscheinlicher gehalten wird.

Hier wurde ia. die zweiseitige Fragestellung beurteilt.

4. ERGEBNISSE

4.1. ABS- und MGP-Aufnahme in Yoshida-Tumorzellen

Zur Festlegung optimaler Versuchsbedingungen wurde die Abhängigkeit der Aufnahme von ABS und MGP von der Zeit, der Temperatur, dem pH-Wert und dem Natriumgradienten an Yoshida-Tumorzellen nach zweitägigem Wachsen in normalem Eagle MEM untersucht.

Die ABS- und MGP-Aufnahme wurde über drei Stunden gemessen, um zu untersuchen, ob eine intrazelluläre Anreicherung erfolgt. Wie Abb. 2 zeigt, war die Nettoaufnahme des MGP bis 3 Stunden, die der ABS bis ca. 30 min nahezu linear. Es ist daher gerechtfertigt, die Transportgeschwindigkeit v aus der Steigung der Regressionsgerade bis 30 min zu bestimmen. Danach verringerte sich die Aufnahmegeschwindigkeit; nach 180 min war

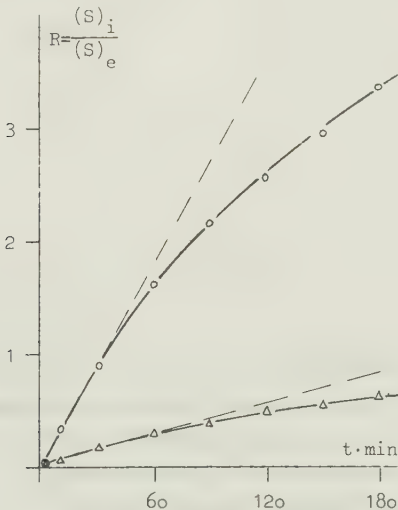


Abb. 2 Anreicherung als Verhältnis R der intrazell. $(S)_i$ zur extrazell. $(S)_e$ Substratkonz. von ABS (o - o) und MGP (Δ - Δ). Zellkonzentration: $2.9 \cdot 10^5$ Zellen/ml, Medium: KRP-Puffer.

für beide Substrate jedoch noch kein stationärer Zustand (steady state) erreicht. Die Yoshida-Tumorzellen hatten bis dahin ABS intrazellulär auf ca. das Dreifache der extrazellulären Konzentration angereichert, während die intrazelluläre MGP-Konzentration die extrazelluläre nicht erreichte (Tab. 2). Daraus ergibt sich für ABS ein aktiver und für MGP ein passiver Transport.

TAB. 2 Anreicherung von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglukopyranosid in Yoshida-Suspensionskulturzellen nach 180 min Inkubation.
 v_{in} = Aufnahmegeschwindigkeit, $(S)_e$ = extrazelluläre Substratkonzentration.

	$R = \frac{(S)_i}{(S)_e}$	v_{in}	$(S)_e$
		$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	$\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$
ABS	3.38 ± 0.07	2.95 ± 0.10	0.1
MGP	0.61 ± 0.02	6.74 ± 0.53	1.2

Weiterhin wurde der Transport von ABS und MGP in die Zelle bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Aufnahmegeschwindigkeit beider Substrate ist bei pH 7 am höchsten (Tab.3). Im basischen Bereich bis pH 9 zeigt sich eine geringfügige Abnahme. Im sauren Bereich bei pH 6 ist eine signifikante ($p < 0.05$) Verminderung der Aufnahmegeschwindigkeit für beide Substrate festzustellen.

TAB. 3 pH-Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglukopyranosid bei Yoshida-Tumorzellen. KRP-Puffer wurde mit 1molarer HCl bzw. 0.3molarer Tris-Lsg. auf den gewünschten pH gebracht. Osmolalität 278 ± 7 mosmol/kg; Zellkonzentration im ABS-Ansatz $2.5 \cdot 10^7$, im MGP-Ansatz $3.7 \cdot 10^7$ Zellen/ml; Transportsubstrate: $(\text{ABS})_e$ 0.12 ± 0.01 , $(\text{MGP})_e$ 1.77 ± 0.06 mmol/l.

ABS			MGP		
pH	v_{in}		pH	v_{in}	
	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	%		$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	%
6.1	0.83 ± 0.12	65.8	6.0	8.77 ± 0.62	63.7
7.0	1.27 ± 0.14	100	7.0	13.76 ± 1.02	100
7.9	0.91 ± 0.18	71.8	7.9	12.22 ± 0.56	88.8
9.0	0.94 ± 0.18	74.2	8.9	11.59 ± 1.04	84.2

Drittens wurde die Aufnahme von ABS und MGP in Yoshida - Tumorzellen bei den Temperaturen 0° , 25° und 37° C gemessen. Erwartungsgemäß war für beide Substrate die Transportgeschwindigkeit bei 37° C am höchsten (Tab. 4). Ebenfalls für beide Substrate gilt, daß die Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Temperatur nicht linear ist, was auf den frühen Übergang vom flüssig-kristallinen zum kristallinen Zustand der Lipoidschicht der Zellmembran zurückzuführen ist. Dabei ist die Geschwindigkeit der ABS - Aufnahme bei 25° C stärker - nämlich auf 1/6 - vermindert als die der MGP, die auf 1/4 ihrer Größe bei 37° C sank. Bei $0 - 4^\circ$ C (Eisbad) war keine signifikant ($p > 0.05$) von 0 verschiedene Aufnahme meßbar.

TAB. 4 Temperaturabhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglukopyranosid bei Yoshida-Tumorzellen. Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (Colora-Wasserbäder). Zellkonzentration im ABS-Ansatz $1.1 \cdot 10^7$, im MGP-Ansatz $2.8 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Extrazell. Transportsubstratkonz. $(\text{ABS})_e$ 0.117 ± 0.004 , $(\text{MGP})_e$ 1.09 ± 0.09 mmol/l.

TEMPERATUR °C	AUFNAHMEGESCHWINDIGKEIT v_{in}			
	ABS		MGP	
	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	%	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	%
37	2.37 ± 0.32	100	5.42 ± 0.69	100
25	0.40 ± 0.08	16.8	1.40 ± 0.59	25.8
0-4	keine Aufnahme		keine Aufnahme	

Da im Magnesiummangel der Natriumkonzentrationsgradient bei Yoshida-Tumorzellen erniedrigt ist, wurde die ABS- und MGP-Aufnahme bei einem erniedrigten Na^+ -Konzentrationsgradienten gemessen. Um die Konzentration des extrazellulären Na^+ so weit wie möglich herabzusetzen und für die Dauer des Versuches konstant zu halten, wurden die Zellen vorher durch Waschen in einem Cholin-Medium an Na^+ verarmt. In diesem Medium wurden auch die Transportversuche durchgeführt. Die Na^+ -Konzentration der Kontrollansätze betrug 140 mmol/l. Es zeigte sich (Tab. 5) ein deutlicher Einfluß des Na^+ -Konzentrationsgradienten auf die ABS-Aufnahmegeschwindigkeit, die um ca. 70 % unter der des Kontrollansatzes lag, während der Na^+ -Konzentrationsgradient um mehr als 99 % gesenkt war. Es verbleibt also ein vom Na^+ -Gradienten unabhängiger Teil der ABS-Aufnahmegeschwindigkeit von ca. 30 %. Für MGP ist keine signifikante ($p < 0.05$) Aufnahmeminderung durch die Senkung des Na^+ -Konz.gradienten festzustellen.

TAB. 5 Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglukopyranosid vom Na^+ -Konzentrationsgradienten bei Yoshida-Tumorzellen. Die Zellen wurden zur Na^+ -Verarmung dreimal in einem Na^+ -freien Medium für 15 min bei $2-8^\circ\text{C}$ inkubiert und gewaschen (40 ml-Gefäße, 4°C , 200 g, 10 min). Zusammensetzung des Wasch- und Inkubationsmediums: Tris-HCl-Puffer mit 0.1 molarer HCl auf pH 7.1 gebracht, Tris 4, CaCl_2 1, MgCl_2 1, KCl 5, Cholin-Cl (bzw. NaCl im Kontrollansatz) 140 mmol/l, Osmolalität 275 mosmol/kg; gemessene $(\text{Na}^+)_e$ im Na^+ -armen Ansatz 0.5 mmol/l, konstant während der Inkubationsdauer; Zellkonzentration im Na^+ -armen Ansatz $4 \cdot 10^7$, im Kontrollansatz $3.7 \cdot 10^7$ Zellen/ml; Extrazell. Transportsubstratkonz. $(\text{ABS})_e$ 0.11 ± 0.01 , $(\text{MGP})_e$ 1.07 ± 0.05 mmol/l.

Na^+ -GRAD. AUFNAHMEGESCHWINDIGKEIT v_{in}

$\frac{(\text{Na}^+)_e}{(\text{Na}^+)_i}$	ABS		MGP	
	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	%	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	%
0.02	0.34 ± 0.04	28.5	8.12 ± 1.34	77.9
2.23	1.19 ± 0.05	100	10.42 ± 0.95	100

Die folgenden ABS- und MGP-Transportversuche wurden dementsprechend über eine Zeit von 30 min bei 37°C und pH 7 und einer extrazellulären Na^+ -Konzentration von ca. 140 mmol/l durchgeführt.

4.2. Transport nach Wachstum unter Magnesiummangel

Yoshida-Tumorzellen wurden 6 - 8 Tage in magnesiumarmem Eagle MEM oder RPMI 1640 in Suspensionskulturen gezüchtet und an ihnen der Na^+ -, ABS- und MGP-Transport im Vergleich zu in normalem Medium gezüchteten Yoshida-Tumorzellen untersucht.

Na^+ -Efflux

Um entscheiden zu können, ob nur der passive K^+ -Efflux (GÜNTHER u. AVERDUNK 1970), aber nicht die aktive Na^+ - K^+ -Pumpe vom Magnesiummangelwachstum beeinflusst wird, wurde der aktive Na^+ -Efflux mit $^{22}\text{Na}^+$ an magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen bestimmt. Trägt man die intrazelluläre $^{22}\text{Na}^+$ -Konzentration halblogarithmisch gegen die Inkubationszeit auf (Abb. 3), so kann man nach RADKLIFFE (1974) als Parameter des

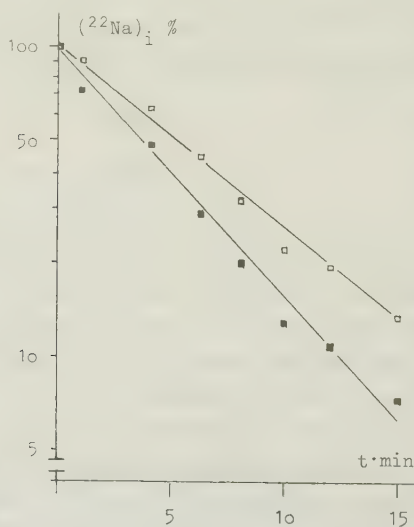


Abb. 3 Na^+ -Efflux bei magnesiumarm gewachsenen Yoshidatumorzellen. Die intrazell. ^{22}Na -Aktivität (^{22}Na)_i in % ihres Ausgangswertes zur Zeit 0 wurde halblogarithmisch gegen die Inkubationszeit t in min aufgetragen. Vorinkubation in Eagle-Medium mit 5% foetalem Kälberserum für 60 min mit (^{22}Na)_e = 20 mCi/l bei 37 °C. Magnesiumarm (■ - ■), normal (□ - □).

$^{22}\text{Na}^+$ - Effluxes bis 10 min eine Geschwindigkeitskonstante k erhalten (s. Teil 3.3.). Diese betrug für die magnesiumarm gewachsenen Zellen $k = 0.02 / \text{h}$ und für die Kontrolle $k' = 0.015 / \text{h}$, d.h. der aktive, also mit 10^{-3} mol/l Ouabain hemmbare Na^+ -Efflux ist bei den magnesiumarm gewachsenen Zellen um etwa $1/3$ erhöht. Demnach muß, da die intrazelluläre Na^+ -Konzentration (GÜNTHER u. AVERDUNK 1970) trotz höherer Pumpleistung erhöht ist, auch der passive Na^+ -Influx erhöht sein.

(^3H) Ouabain - Bindung

Zur Entscheidung, ob die erhöhte Leistung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - Pumpe auf einer Erhöhung ihrer Aktivität oder ihrer Zahl an Pumpstellen beruhte, wurde die (^3H) Ouabain-Bindung pro Zelle gemessen. Bei 37°C wurden an die Yoshida-Tumorzellen ca. $8 \cdot 10^5$ Ouabainmoleküle pro Zelle gebunden. Zwischen den magnesiumarm gewachsenen und den Kontrollzellen ergab sich dabei jedoch kein deutlicher Unterschied. Die Geschwindigkeit der Ouabain-Bindung war ebenfalls bei den normal und magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen nicht unterschiedlich (Abb. 4).

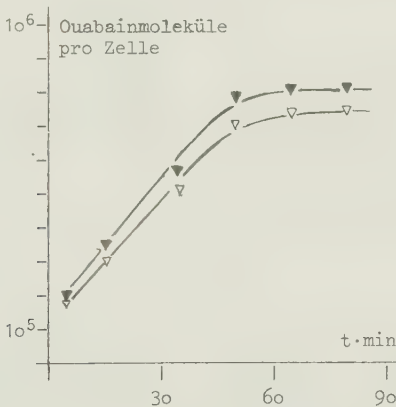


Abb. 4 ^3H -Ouabainbindung an Yoshidatumorzellen bei 37°C . Medium: s. Abb. 3, Zellkonz.: $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $(^3\text{H}\text{-Ouabain})_0 = 100 \text{ nmol/l}$. Die angegebenen Bindungsstellen pro Zelle wurden nach Abzug der unspezifischen Bindung erhalten. Magnesiumarm ($\nabla - \nabla$), normale Kontrolle ($\nabla - \nabla$).

γ -Aminobuttersäure-Transport

Es sollte untersucht werden, ob der aktive Aminosäuretransport ebenfalls durch Magnesiummangel verändert wird. Die Aufnahmegeschwindigkeit von ABS war bei den unter Magnesiummangel gewachsenen Yoshida-Tumorzellen geringfügig kleiner, aber gegenüber den Kontrollzellen signifikant ($p < 0.05$), s. Abb. 5a und Tab. 6. Daher wurde die ABS-Aufnahmekinetisch nach LINEWEAVER BURK untersucht und im entsprechenden Diagramm aufgetragen (Abb. 6). Die daraus errechnete maximale Aufnahmegeschwindigkeit $v_{\max}$ von ABS war bei den magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen gegenüber der Kontrolle etwa gleich, aber k_m war um ca. $1/4$ höher, d.h. die Affinität der ABS zum Transportsystem war gesunken (Tab. 7). Der reziproke Affinitätsparameter k_m wird in der Literatur häufig k_{in} (Influxkonstante) genannt. Die Abgabegeschwindigkeit der ABS war bei den magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen gegenüber den Kontrollzellen nicht signifikant ($p > 0.05$) verändert (Abb. 5b und Tab. 6).

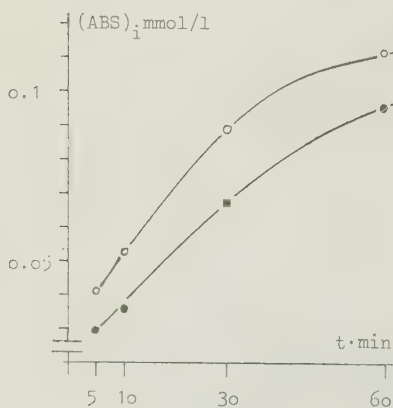


Abb. 5a ABS-Aufnahme in magnesiumarm gewachsene Yoshidatumorzellen. $(ABS)_e = 0.13$ mmol/l; Medium: KRP-Puffer; (●-●) magnesiumarm, Zellkonz.: $2.4 \cdot 10^7$ Zellen/ml; (o-o) Kontrolle, Zellkonz.: $3.2 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

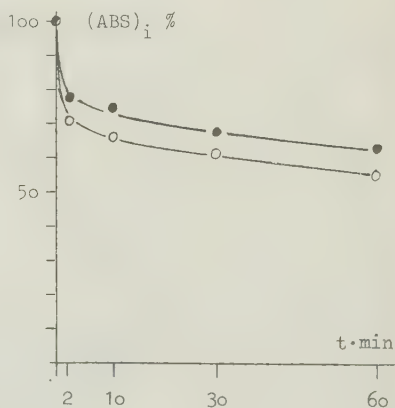


Abb. 5b ABS-Abgabe aus magnesiumarm gewachsenen Yoshidatumorzellen. 60 min Vorinkubation in KRP-Puffer mit $(ABS)_e = 0.25$ mmol/l. (●-●) magnesiumarm, Zellkonz.: $3.2 \cdot 10^7$ Zellen/ml; (o-o) Kontrolle, Zellkonz.: $4.5 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

TAB. 6 Transportgeschwindigkeiten von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglukopyranosid bei normal und magnesiumarm gewachsenen Yoshidakulturzellen aus der Steigung der Regressionsgeraden bis 30 min Inkubationsdauer. $(S)_e$ extrazelluläre, $(S)_{i,t_0}$ intrazelluläre Substratkonzentration, letztere zu Beginn der Aufnahme bzw. Abgabe.

*) $(S)_e$ während der Vorinkubation (60 min).

	AUFNAHMEGESCHWINDIGKEIT		$(S)_e$	$(S)_{i,t_0}$
	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$		$\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$	$\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$
	MG-ARM	KONTROLLE		
ABS-AUFNAHME	1.53 $\pm$ 0.10	1.87 $\pm$ 0.15	0.13	0
" ABGABE	0.92 $\pm$ 0.10	1.02 $\pm$ 0.15	0.25*	0.28
MGP-AUFNAHME	7.00 $\pm$ 0.92	10.10 $\pm$ 1.2	1.03	0
" ABGABE	11.6 $\pm$ 0.61	13.98 $\pm$ 1.62	2.16*	1.63

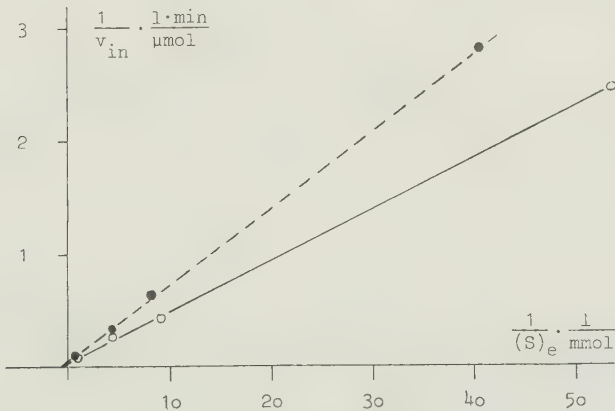


Abb. 6 Lineweaver-Burk -Diagramm für die ABS-Aufnahme in Yoshidatumorzellen; Berechnung der Transportgeschwindigkeiten wie bei den anderen Versuchen. Medium: KRP-Puffer; (●---●) magnesiumarm, Zellkonz.: $2.7 \cdot 10^7$ Zellen/ml; (○ - ○) normal gewachsene Kontrolle, Zellkonz.: $3.5 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Errechnete Transportparameter s.Tab.7.

α -Methylglukopyranosid-Transport

An diesem bei den Yoshida-Tumorzellen passiven Carrier-Transportsystem sollte untersucht werden, ob noch weitere Membranfunktionen durch den Magnesiummangel beeinflusst worden sind. Die Aufnahme- und Abgabegeschwindigkeit von MGP zeigte bei den magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen zwar erkennbare aber nicht signifikante ($p > 0.05$) Veränderungen (Abb. 7 a und b, Tab. 6).

Auch die MGP-Aufnahme wurde kinetisch nach LINEWEAVER BURK untersucht und im entsprechenden Diagramm dargestellt (Abb. 8). Die daraus errechneten beiden Transportparameter, maximale Aufnahmegeschwindigkeit $v_{in,max}$ von MGP sowie der reziproke Affinitätsparameter k_m zeigten ebenfalls keine deutlichen Unterschiede (Tab. 7).

Transportparameter für verschiedene Aminosäuren und Zucker an anderen Zellsystemen sind zum Vergleich in Tab. 13 zusammengestellt.

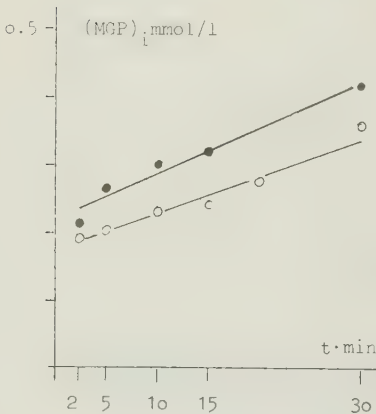


Abb. 7a MGP-Aufnahme in magnesiumarm gewachsene Yoshidatumorzellen. $(MGP)_e = 0.54$ mmol/l; Medium: KRP-Puffer; (▲ - ▲) magnesiumarm, (△ - △) Kontrolle; Zellkonz.: $1.9 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

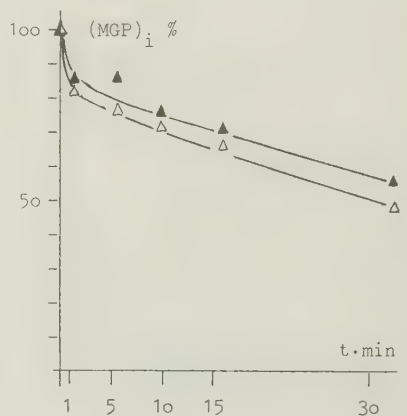


Abb. 7b MGP-Abgabe aus magnesiumarm gewachsenen Yoshidatumorzellen. 60 min Vorinkubation in KRP-Puffer mit $(MGP)_e = 2.4$ mmol/l. (▲ - ▲) magnesiumarm, Zellkonz.: $7.7 \cdot 10^7$ Zellen/ml; (△ - △) Kontrolle, Zellkonz.: $6.7 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

TAB. 7 Parameter der Aufnahme von γ -Aminobuttersäure und α -Methylglukopyranosid bei magnesiumarm gewachsenen Yoshidatumorzellen, erhalten aus dem Lineweaver-Burke-Diagramm: Maximale Aufnahmegeschwindigkeit $v_{in,max}$ als Kapazitätsparameter und die scheinbare Influxkonstante k_{in} als reziproker Affinitätsparameter.

	$v_{in,max} \cdot \frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	$k_{in} \cdot \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$
ABS-Mg-arm	24.2	1.65
" Kontrolle	28.9	1.3
MGP-Mg-arm	494	49
" Kontrolle	429	47

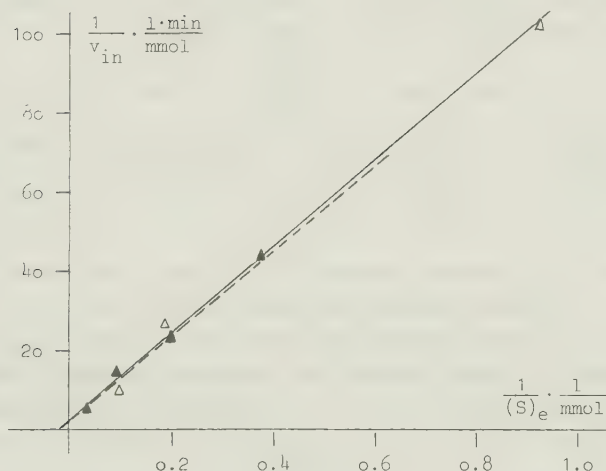


Abb. 8 Lineweaver-Burk -Diagramm für die MGP-Aufnahme in Yoshidatumorzellen, Berechnung der Transportgeschwindigkeit wie bei den anderen Versuchen. Medium: KRP-Puffer; ($\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$) magnesiumarm, $2.2 \cdot 10^7$ Zellen/ml; (Δ - Δ) normal gewachsene Kontrolle, $2.9 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Errechnete Transportparameter s.Tab. 7 .

4.3. Einfluß von Ado-3':5'-P auf den Kationengehalt bei Yoshida-Tumorzellen

Es sollte untersucht werden, auf welchem Wege die Magnesiummangelwirkungen zustande kommen.

Beim Wachstum unter Magnesiummangel wurden besonders starke Veränderungen im braunen Fettgewebe gefunden, in dem dank starker sympathischer Innervation viel Noradrenalin freigesetzt wird (GÜNTHER et al. 1973). In Leberzellen wurde durch Noradrenalin - und damit durch Ado-3':5'-P - der K^+ -Efflux und der Ca^{++} -Efflux erhöht (FRIEDMANN 1968, SOMLYO 1971).

Eine der Hauptveränderungen bei Magnesiummangel ist aber gerade der erhöhte K^+ -Efflux (GÜNTHER u. AVERDUNK 1970), doch der Ca^{++} -Gehalt liegt bei den magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen um 48 % über dem der Kontrollzellen (Tab.8), während der Mg^{++} -Gehalt um 21 % abnimmt.

TAB. 8 Intrazelluläre Calcium- und Magnesiumkonzentration nach 6 Tagen Wachstum unter Magnesiummangel bei Yoshida-Tumorzellen, signifikante Veränderungen ($p < 0.001$).
Medium: RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum.

	Mg^{++} -arm	Kontrolle	
Calcium	2.17 ± 0.07	1.47 ± 0.21	mmol/kg FG
Magnesium	12.4 ± 0.3	15.7 ± 0.3	"

Zudem war unter Magnesiummangel in einigen Rattenorganen der Ado-3':5'-P-Gehalt erhöht (GÜNTHER et al. 1972/73).

In geringerem Maße konnte dies nun auch bei den magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen beobachtet werden: Der Gehalt an Ado-3':5'-P war mit 4.9 ± 0.17 gegenüber den normal gewachsenen Zellen mit 4.3 ± 0.16 pmol/mg Protein um 14 % erhöht.

Es sollte daher geprüft werden, ob die Erhöhung des Ado-3':5'-P-Gehaltes für die bisher festgestellten Permeabilitätsänderungen der Zellmembran im Magnesiummangel verantwortlich ist. Dazu wurde der Ado-3':5'-P-Gehalt normaler Yoshida-Tu-

morzellen experimentell durch Inkubation bei steigenden extrazellulären Ado-3':5'-P-Konzentrationen erhöht. Nach 60 min Inkubation wurde der Zellgehalt an Na^+ , K^+ , Ca^{++} und Mg^{++} bestimmt (Tab. 9). Bei der höchsten gewählten extrazellulären Konzentration von Ado-3':5'-P hatten sich die Zellgehalte dieser Kationen in der gleichen Richtung wie bei Magnesiummangel (vergl. Tab. 8 u. 10) verändert: Der K^+ -Gehalt war um 3 % und der des Mg^{++} um 8 % erniedrigt, der Na^+ -Gehalt dagegen um 15 % und der des Ca^{++} um 30 % gestiegen.

TAB. 9 Intrazelluläre Kationenkonzentrationen bei steigenden extrazellulären CAMP-Konzentrationen.

$1 \cdot 10^7$ Zellen/ml wurden mit Dibutyryl-CAMP 60 min bei 37°C inkubiert.

$(\text{CAMP})_e$	$(\text{Na})_i$	$(\text{K})_i$	$(\text{Ca})_i$	$(\text{Mg})_i$
$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$	$\frac{\text{mmol}}{\text{kg TG}}$		$\frac{\text{mmol}}{\text{kg FG}}$	
0	60.0	289.5	1.47	15.8
0.1	61.6	287.8	1.62	15.9
1	62.4	278.5	1.62	15.8
10	64.5	284.3	1.73	14.7
100	69.0	280.5	1.91	14.6

5. DISKUSSION

Transportsystem

Wie in der Einführung dargelegt, sollte der Einfluß des Magnesiummangels u.a. auf den Membrantransport von ABS und MGP an Yoshida-Tumorzellen untersucht werden, die in Suspensionskulturen gezüchtet worden waren.

Da der Aminosäure- und Zuckertransport an Yoshida-Tumorzellen bisher noch nicht untersucht worden ist, wurde zur Eingrenzung der Versuchsbedingungen die ABS- und MGP-Aufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit, dem pH-Wert, der Temperatur und dem Na^+ -Konzentrationsgradienten gemessen.

Die häufig für die Untersuchung des Aminosäuretransports gewählten (HEINZ 1954, 1957, 1972, JACQUEZ et al. 1969, KROMPHARDT 1963 a u. b, SCHAFER 1967) EHRlich-Maus-Ascites-Tumorzellen (EMAT-Zellen) konnten für diese Arbeit nicht verwendet werden, da sie in der Kultur nicht wachsen.

Aminosäure- und Zuckertransport wurden außer an EMAT-Zellen an Organzellen - wie Erythrozyten (KABACK et al. 1966, GECK 1971, JUNG et al. 1971, LIEB u. STEIN 1972, TERRY 1972), Nierenrindenzellen (KLEINZELLER 1967 a,b, SEGAL et al. 1967, SCHWARTZMANN et al. 1967, KOLINSKA 1970, ALMENDAREZ 1971), Darmepithelzellen (BIHLER 1962, GRACEY 1972), Fettgewebe (CATER 1972), Knochen- (ROSENBUSCH 1967) und Muskelzellen (BIHLER 1971) - und an Mikroorganismen (DRAPEAU u. MacLEOD 1963, KABACK 1966, ROSEN 1971, STOCK u. ROSEMAN 1971, WOLFINBARGER u. GIB DeBUSK 1971) und Pflanzenzellen (MARETZKI u. THOM 1970) untersucht.

Die Yoshida-Tumorzellen zeigten ein gleichartiges Transportverhalten wie andere Zellen (s. auch Tab. 10) :

Sie reicherten ABS innerhalb von 3 h Inkubationszeit mehr als dreifach an (Bei 0.1 mmol/l (ABS)_e; die extrazellulären Konzentrationen im RPMI 1640 u. Eagle MEM liegen je nach Aminosäure zwischen 0.1 bis 2.0 mmol/l). Die intrazelluläre Anreicherung ist i.a. umso größer, je niedriger die extrazelluläre Konzentration ist. So wurde z.B. in EMAT-Zellen eine 2000-fache Anreicherung bei der physiologischen Taurinkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ im Ascites, aber bei 3 mmol/l im Test-

AMS	$V_{in, max} \frac{\text{mmol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	$K_{in} \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$	ZELLART	pH	Temp. °C	LITERATUR
γ -ABS *	0.029	1.3	Yosh.susp.kult.Z.	7	37	Diese Arbeit
Taurin	0.081	0.18	EMAT-Zellen	7.4	37	KROMPHARDT 1963 a
Glycin	5.3	2.8	"	7.4	37	"
"	14.1	4.9	"	7.4	28	HEINZ 1954
"	17.8	3.7	"	7.4	37	"
α -AIB	0.42	0.72	Isolierte Kücken-embryoherzzellen	n.a.	n.a.	GAZOLLA 1972
Lysin	2.5	50	Rattennierenrin-	7.4	n.a.	SEGAL 1967
Glycin	5	50	denstückchen	7.4	n.a.	"
ZUCKER						
α -MGP	0.43	47	Yosh.susp.kult.Z.	7	37	Diese Arbeit
"	1.7	8.2	Kaninchennieren-	7.4	25	KLEINZELLER 1967 b
Glucose	0.5	2.1	rindenstückchen	7.4	25	" 1967 a
Galaktose	1.1	1.3	"	7.4	25	KOLINSKA 1970
Glucose	386	19.5	Human.Erythro.	7.4	24	JUNG 1971
"	139	25	"	7.4	20	KARLISH 1972

ansatz nur eine anderthalbfache Anreicherung gefunden (KROMPHARDT 1963 a). Die aktive Aminosäureanreicherung ist vielen Zellarten möglich (Übersicht bei RING 1970). Bei dem Vergleich von Werten aus der Literatur (Tab. 11) sind unbedingt die unterschiedlichen Versuchsbedingungen sowie die Verschiedenheit der Transportsysteme zu bedenken.

TAB. 11 Anreicherung R verschiedener Aminosäuren AMS in EMAT-Zellen zum Vergleich mit *Yoshida-Suspensionskulturzellen (2 Tage Wachstum). Literaturauswahl.

AMS	$R = \frac{(AMS)_i}{(AMS)_e}$	$(AMS)_e \cdot \frac{mmol}{l}$	LITERATUR
γ-ABS *	3.4	0.1	Diese Arbeit
Glycin	14.7	0.75	HEINZ 1957
"	6.1	3.9	"
L-Trypt.	1.9	2	JACQUEZ 1969
"	2	1	SCHAFER 1967
L-Phen.al.	4.2	1	"
Taurin	1.5	3	KROMPHARDT 1963 a
"	2000	0.01	"

Das Zuckeranalogon MGP reicherten die Yoshida-Tumorzellen dagegen auch nach 3 h Inkubation nicht an (R ca. 0.6). Der Zuckertransport ist bei den meisten Körperzellen passiv (WIL-BRANDT 1961, LIEB u. STEIN 1972). In Nierenrindenstückchen wurde dagegen ein $R = (S)_i / (S)_e$ von 7.9 bzw. 6.3 bei 0.3 bzw. 1.0 mmol/l $(MGP)_e$ gemessen; allerdings reicherten die gleichen Zellen O-Methyl-D-Glukose nicht an (KLEINZELLER et al. 1967, KOLINSKA 1970). Auch ALMENDARES beschrieb 1971 aktiven MGP-Transport in Nierenrindenzellen. Darmepithelzellen können Zucker ebenfalls aktiv transportieren (GRACEY et al. 1972). Hamster-Dünndarmzellen reicherten 7-deoxy-glukoheptose z.B. mehr als 20-fach bei 0.3 mmol/l extrazellulärer Konzentration

an (BIHLER u. CRANE 1962). Erwähnenswert ist, daß Bakterien Zucker durch Cotransport an aktive Transportsysteme gekoppelt aufnehmen können (STOCK 1971).

Das pH-Optimum der ABS- und MGP-Aufnahme in die Yoshida-Tumorzellen war nur schwach ausgeprägt. Bei verschiedenen Aminosäuren wird über unterschiedliche pH-Effekte auf die Aufnahmegeschwindigkeit berichtet (SEGAL et al. 1967): Z.B. gibt es für Arginin ein pH-Optimum bei 7.4 ; die Diaminobuttersäureaufnahme zeigte dagegen mit steigendem pH eine kontinuierliche Zunahme; der pH-Effekt auf die Lysinaufnahme war von der extrazellulären Lysinkonzentration abhängig: Bei 0.065 mmol/l (Lys)_e lineare Zunahme mit steigendem pH, bei 15 mmol/l (Lys)_e Optimum bei pH 7.8 ; insgesamt zeigte sich jedoch eine gemeinsame Beziehung: Je basischer der pH, desto größer die Aminosäureaufnahme. - Für die Zuckeraufnahme wurde bei Erythrozyten statt eines pH-Optimums wie bei den Yoshida-Tumorzellen ein kontinuierlicher Anstieg zwischen pH 5 - 9 gefunden (JUNG et al. 1971).

Stärker als vom pH war die ABS- und MGP-Aufnahme der Yoshidatumorzellen von der Temperatur abhängig. Die Temperatursenkung von 37 auf 25 °C verminderte die ABS-Aufnahme um 83 % und die MGP-Aufnahme um 74 %. Eine ähnliche Temperaturabhängigkeit fanden ROSENBUSCH et al. (1967) bei der α -Aminobuttersäureaufnahme in Knochenzellen. In Nierenrindenzellen stellten SCHWARTZMANN et al. (1967) fest, daß bei 21 °C Nettoinflux und Countertransport von Arginin und Lysin vermindert waren, ebenfalls der Austauschtransport von Arginin, nicht aber der von Lysin. - Die Temperaturabhängigkeit der Zuckeraufnahme wurde eingehend an Erythrozytenghosts untersucht (JUNG et al. 1971). Der Zuckerinflux im steady state war dabei unterhalb von 20 °C noch sehr viel stärker (ca. fünffach) von Temperaturänderungen abhängig als oberhalb von 20 °C.

Heute wird allgemein eine Kopplung des aktiven Aminosäuretransportes und eventuell des Zuckertransportes (letzterer nur in Nieren- und Darmgewebe) an den aktiven Na⁺-Trans -

port (siehe dazu auch S.42 dieser Arbeit)angenommen(Über-sicht s. 11.Konf.Gesell.Biol.Chem. 1972, Org.: E.HEINZ).Nach GÜNTHER u.AVERDUNK (1970) ist nun der einwärts gerichtete Na^+ -Konzentrationsgradient im Magnesiummangel durch eine Zu-nahme der intrazellulären Na^+ -Konzentration erniedrigt. Ex-perimentell kann dieser Gradient auch durch eine Senkung der extrazellulären Na^+ -Konzentration erniedrigt werden. Bei ex-trazellulärem Na^+ -Mangel konnten z.B.ROSENBUSCH et al. (1967) wie erwartet am Beispiel der α -Aminoisobuttersäure-Aufnahme in Knochenzellen eine Aufnahmeverminderung um ca. 2/3 nach-weisen. Auch bei EMAT-Zellen wurde eine Na^+ -Gradientenabhän-gige Aminosäureaufnahme nachgewiesen (KROMPHARDT et al.1963, HEINZ u.GECK 1974), ebenso bei Taubenerythrozyten (TERRY u. VIDAVER 1972) und Mikroorganismen (DRAPEAU u.MacLEOD 1963). Eine Abhängigkeit der Aufnahme und des Countertransportes basischer Aminosäuren in Ratten-Nierenrindenzellen vom Na^+ -Gradienten war dagegen nicht bei jeder der untersuchten Ami-nosäuren vorhanden(SCHWARTZMANN et al. 1967).

Für die Zuckeraufnahme wurde eine Abhängigkeit vom Na^+ -Gra-dienten nur bei bestimmten Zellarten gefunden: Bei Bakteri-en (STOCK u.ROSEMAN 1971), in Darmzellen (BIHLER und CRANE 1962) und abhängig vom transportierten Zucker auch in der Nierenrinde (KOLINSKA 1970).

Die Yoshida-Tumorzellen entsprachen auch in dieser Hinsicht üblichen tierischen Zellen: Ca. 70 % der ABS-Aufnahme zeig-ten sich von dem einwärts gerichteten Na^+ -Konzentrationsgra-dienten abhängig; die MGP-Aufnahme wurde dagegen von diesem Gradienten nicht beeinflusst.

Transport nach Wachstum unter Mg^{++} -Mangel
In der Einführung wurde auf die biochemischen Veränderungen nach Magnesiummangelwachstum hingewiesen, die im Tierversuch festgestellt werden konnten. Doch erst bei schnell wachsenden Zellen wie Rattenembryonen oder Bakterien (GÜNTHER et al. 1968/73) und eben den Yoshida-Tumorzellen (GÜNTHER und AVERDUNK 1970) traten die Mangelercheinungen deutlicher hervor.

Das Wachstum der Yoshida-Tumorzellen in den magnesiumarmen Kulturen war schon nach wenigen Tagen gegenüber den Kontrollkulturen stark verlangsamt (Tab. 12). Dies bestätigte die

TAB. 12 Wachstumsprotokoll, Suspensionskultur Nr. 39, eine Mg-arme und eine Mg - normale Kultur im Vergleich. Medium : Eagle MEM mit 10% dialysiertem Kälberserum und 5% fötalem Kälberserum. Anfangsvolumen 250 ml, Anfangszellkonzentration $2.4 \cdot 10^5$ Zellen/ml .

WACHSTUMS- DAUER h	ZELLMENGE	
	Mg-arm 10^8 Zellen/Kultur	Kontrolle
Einsaat	0.6	0.63
37	1.28	1.15
71	2.25	2.3
117	2.4	3.74
163	2.5	9.51
180	2.79	11.9

1970 von GÜNTHER u. AVERDUNK gefundene Wachstumsminde-
rung ; dabei war in den Yoshida-Tumorzellen der Einbau radioaktiv
markierter Bausteine (Leucin, Uridin, Thymidin) in Protein,
RNS und DNS nach 6 - 8 Tagen magnesiumarmen Wachstums herab-
gesetzt. ATP-Gehalt, O_2 - und Glucoseverbrauch sowie die Lak-
tatbildung der Zellen als Meßgrößen des Energiestoffwechsels

hatten sich dagegen nicht verändert. Einige intrazelluläre Kationen zeigten starke Verschiebungen (Tab. 13) und der K^+ -Efflux hatte zugenommen. Als mögliche Ursache wurde u.a. eine Permeabilitätsänderung der Zellmembran vermutet. Eine Veränderung der Membran-ATPase konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

TAB. 13. Intrazelluläre Kationenkonzentrationen nach 8 Tagen magnesiumarmem Wachstum in der Kultur. Medium: Eagle mit 10% dialysiertem und 5% fötalem Kälberserum. Zusammenestellt nach GÜNTHER u. AVERDUNK 1970.

KATION	Mg-arm	Kontrolle	
Calcium	2.5	1.1	mmol/kg FG
Magnesium	5	9.9	"
Natrium	186	91	mmol/kg TG
Kalium	132	290	"

Eine Permeabilitätsänderung könnte den Transport weiterer Moleküle beeinflussen. Dies sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen bei Magnesiummangel einen um 30 % erhöhten aktiven Na^+ -Efflux bei unveränderter (3H) Ouabain-Bindung pro Zelle. Parallel zu dem erniedrigten Na^+ -Gradienten ist die aktive ABS-Aufnahme um ca. 18 % vermindert. Die passive ABS-Abgabe sowie die passive MPG - Aufnahme und -Abgabe sind nicht signifikant ($p > 0.01$) verändert. Das zelluläre Ado-3':5'-P ist um ca. 12 % erhöht, eine Abnahme des Magnesiumgehaltes sowie eine Zunahme des Calciumgehaltes der Zellen unter Magnesiummangel wurde bestätigt. Der oben erwähnte unter den Kationenveränderungen hervorstechende K^+ -Verlust beruhte auf einer Zunahme des passiven K^+ -Effluxes. Der erhöhte aktive Na^+ -Efflux zeigt nun, daß die Na^+ - K^+ -Pumpe aktiviert wurde. Folgende Vorgänge könnten also den veränderten Na^+ - und K^+ -Gehalt und die veränderten Flüsse

verursacht haben: Während des Wachstums unter Magnesiummangel könnte sich die Permeabilität der Zellmembran verändern. Dadurch würde vermehrt Na^+ in und K^+ aus der Zelle strömen. Die intrazellulär wachsende Na^+ - und fallende K^+ -Konzentration würden die Na^+ - K^+ -Pumpe aktivieren, dh. der aktive Na^+ -Efflux wird erhöht. Die Transporterhöhung reicht aber nicht aus, um die erhöhte Na^+ - K^+ -Permeabilität zu kompensieren und deren intrazelluläre Konzentrationen zu normalisieren.

Dazu paßt nicht, daß weder die Geschwindigkeit noch die Anzahl der (^3H)Ouabain-Bindungen pro Zelle im Magnesium-Mangel verändert wurden. Es ist allerdings unsicher, ob die Messung der (^3H)Ouabain-Bindung auch bei Aktivierung der Na^+ - K^+ -Pumpe durch intrazelluläre Kationenkonzentrationsänderungen, wie eben im Magnesiummangel, ein zuverlässiges Maß für die Aktivität der Na^+ - K^+ -Pumpe darstellt.

Auch die direkte Bestimmung der ATPase-Aktivität in einer Membranpräparation hatte keine dem erhöhten Na^+ -Transport entsprechende Steigerung ergeben (s.ob.). Bei dieser Bestimmung wiederum wurde die ATPase-Präparation der magnesiumarm gewachsenen Zellen mit den gleichen optimalen Na^+ -, K^+ - und Mg^{++} -Konzentrationen aktiviert wie die der Kontrollzellen. Die veränderte Konzentration dieser Ionen bei den magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen könnte aber zu einer unterschiedlichen ATPase-Aktivität führen.

Es spricht also nicht unbedingt gegen eine veränderte Transportrate im Magnesiummangel, wenn die (^3H)Ouabainbindung und die ATPase-Aktivität nicht signifikant erhöht gefunden wurden.

Der negative Effekt des Magnesiummangels auf das Wachstum könnte durch den K^+ -Verlust bedingt sein. Denn auch eine auf andere Weise herbeigeführte Abnahme der intrazellulären K^+ -Konzentration verursacht eine Abnahme der Proteinsynthese (LUBIN 1967). Bei der Verknüpfung K^+ -Verlust $\rightarrow$ Senkung der Proteinsynthese $\rightarrow$ Rückgang des Wachstums bleibt jedoch der erste Schritt, Magnesiummangel $\rightarrow$ K^+ -Verlust, noch unerklärt.

Auch eine verminderte Bruttoaufnahme von Aminosäuren könnte die Herabsetzung der Proteinsynthese bewirken und so zur Ver-

langsamung des Zellwachstums führen.

Die im Magnesiummangel gefundene Minderung der ABS-Aufnahme (Tab. 6) und der ABS-Affinität zu ihrem Transportsystem (Tab. 7) erscheint jedoch gering. Die verwendeten Kulturmedien (Eagle MEM und RPMI 1640) haben nämlich eine so hohe Aminosäurekonzentration, daß die verringerte Affinität ausgeglichen sein müßte. Daher wird ein verminderter Aminosäuretransport für das verringerte Zellwachstum im Magnesiummangel zumindest nicht allein verantwortlich sein.

Die entsprechenden Parameter des zweiten untersuchten Carriertransportsystems, des MGP-Transportes, blieben unverändert. Die Zahlenwerte dieser Meßgrößen können mit Werten aus der Literatur (Tab. 10) nur mit Vorbehalt verglichen werden. Die z.T. großen Unterschiede beruhen auf unterschiedlichen Zellarten, Bezugsgrößen und nicht zuletzt Versuchsbedingungen. Für diese Arbeit wurden z.B. wegen der hohen Anfangs-Effluxgeschwindigkeit die Yoshida-Tumorzellen nicht gewaschen und filtriert sondern zentrifugiert und die verbleibende interzelluläre ^{14}C -Aktivität abgezogen. Die meisten Untersucher messen ebenfalls nicht die geforderte Initialgeschwindigkeit und nennen die gefundene Michaeliskonstante daher "scheinbare (apparent) Konstante", die nur mit der jeweils verwendeten Methode zu erhalten ist. In dieser Arbeit wurde aus methodischen Gründen die Transportgeschwindigkeit zwischen der kürzesten meßbaren Zeit (1-2 min) und 30 min gemessen. Daher sind $v_{\max}$ und k_m nicht als absolute Größen sondern allein als Vergleichsparameter zwischen den magnesiumarm und den normal gewachsenen Zellen zu betrachten. CRANE 1965, CRANE et al. 1965 nehmen neben anderen Autoren eine Kopplung des Aminosäureinfluxes mit dem Na^+ -Influx an. Na^+ und die Aminosäure durchdringen gemeinsam mit demselben Träger die Zellmembran und dissoziieren beide im Zellinneren ab. Durch die Na^+ - K^+ -Pumpe wird das Na^+ wieder in den extrazellulären Raum geschafft, so daß der einwärts gerichtete Na^+ -Gradient bestehen bleibt. Dieser ist damit die treibende Kraft für die Anreicherung der Aminosäure in der Zelle. Somit wäre der Na^+ -abhängige Aminosäuretransport selbst als erleichterte Diffusion einzustufen und würde erst in Verbin-

dung mit der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe zum "aktiven" Transport.

GECK, HEINZ u. PFEIFFER errechneten 1972, daß die Energieübertragung vom (Gesamt-) Na^+ -Influx auf den AIB-Influx nur einen sehr kleinen Wirkungsgrad von 0.06 habe und der Kopplungsgrad der beiden Fluxe nur 0.5 betrage. Diese Befunde wurden mit sehr kurzer Inkubationszeit (10 sec) an EMAT-Zellen erhoben; der Kopplungsgrad stieg bei Stoffwechselhemmung, statt zu fallen. 1974 berichtigten HEINZ u. GECK ihre Berechnung, indem sie nicht mehr den Gesamt- Na^+ -Influx, sondern nur noch den kleinen Influxanteil des an die Aminosäure gekoppelten (s.ob.) Na^+ mit dem Aminosäureinflux rechnerisch verknüpften und so doch auf einen für jede beobachtete Aminosäureanreicherung genügend hohen Kopplungsgrad kamen. Sie bestätigten also die Theorie von CRANE. Auch MELBOURNE zeigte 1974 die Abhängigkeit des AIB-Influxes von der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe anhand des zellulären ATP-Einflusses auf den AIB-Influx.

Der Na^+ -abhängige Anteil der ABS-Aufnahme (ca. 70 %) in die Yoshida-Tumorzellen erscheint nun auf den ersten Blick recht groß gegenüber der Verminderung dieses Transportes (ca. 20 %) bei Magnesiummangel. Es ist jedoch zu beachten, daß bei diesem Versuch der gesamte Na^+ -abhängige Transportanteil erfaßt wurde. Dabei war der Na^+ -Gradient um den Faktor 100 vermindert, während im Magnesiummangel ja nur die vergleichsweise kleine Na^+ -Gradientenverminderung um den Faktor 2 entsteht. Daraus kann man auch nur eine vergleichsweise kleine ABS-Aufnahmeverminderung erwarten. Letztere wäre also vollständig durch die Erniedrigung des Na^+ -Gradienten zu erklären.

Da auch der passive Anteil des ABS- und der passive MGP-Transport unter Magnesiummangel unbeeinflußt blieben, könnte man in Beschaffenheit und Anzahl unveränderte Carrier annehmen. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß eine mögliche qualitative oder quantitative Veränderung dieser Carrier nicht durch eine ebenfalls veränderte Durchtrittsgeschwindigkeit durch die Lipidschicht der Zellmembran ausgeglichen worden ist.

Ungeklärt bleibt, auf welche Weise im Magnesiummangel die Permeabilitätserhöhung für Na^+ und K^+ bewirkt wird.

Da das gebundene zelluläre Magnesium erniedrigt ist, könnte es für diese Magnesiummangelwirkung verantwortlich sein. Dagegen spricht, daß unter Mg^{++} -Mangel-Ernährung die intramuskuläre Konzentration des Kaliums schon vor der des Magnesiums absinkt (WHANG 1971, WEISS 1972). Andererseits beeinflussen zweiwertige Ionen den Zusammenhalt der Zellmembranaußenseite in Abhängigkeit ihrer Konzentration in der Zellumgebung (TASAKI 1968), so daß die Permeabilitätserhöhung durch ein Abdissoziieren von Magnesiumionen und Membranproteinen verursacht sein könnte. Gegen einen alleinigen Mechanismus dieser Art spricht wiederum, daß die Veränderungen der Transportparameter ja in magnesiumreichem Medium gemessen wurden. Außerdem traten sie nur nach Wachstum unter Magnesiummangel auf und gingen erst nach erneutem Wachsen mit genügend Magnesium zurück (GÜNTHER u. AVERDUNK 1970).

Es darf auch nicht übersehen werden, daß ein anderes zweiwertiges Kation - Calcium - in seinem Zellgehalt unter Magnesiummangel ansteigt. Für Calcium könnte ebenfalls eine erhöhte Permeabilität bestehen. Oder der Calciumanstieg erscheint zum Ausgleich für das fehlende intrazelluläre Magnesium bei verringerter Konkurrenz mit diesem.

Nach WHITTAM 1968 kommt der erhöhte Calciumgehalt der magnesiumarm gewachsenen Zellen als Ursache der erhöhten K^+ - Na^+ -Permeabilität in Betracht. Gegen eine generelle Calciumbeteiligung an der Magnesiummangelwirkung spricht, daß letztere sowohl an hypocalcämischen Ratten als auch an Ca^{++} -frei wachsenden Bakterien hervorgerufen werden konnte (LEHR 1973, GÜNTHER 1968).

Zusätzlich zum Calcium oder allein kann auch ein erhöhter Ado-3':5'-P-Gehalt die passive Permeabilität für K^+ erhöhen (FRIEDMAN u. PARK 1968). Für eine Mitwirkung an den Magnesiummangelerscheinungen spricht die eingangs erwähnte Verstärkung dieser Effekte bei stärkerer sympathischer Innervation und entsprechender Noradrenalinfreisetzung (GÜNTHER

et al.1972/73). Denn eine der zahlreichen Funktionen, an denen die Beteiligung von Ado-3':5'-P als "second messenger" in der Zelle vermutet wird, ist die Hemmung der aktiven Na⁺-K⁺-Pumpe (oder die Erhöhung der passiven Na⁺-K⁺-Permeabilität?) bei höheren Noradrenalin-Konzentrationen (ca. 10⁻⁷ mol/l). Noradrenalin aktiviert dabei die α -Rezeptoren, die die Adenylzyklase hemmen (nicht die Phosphodiesterase aktivieren!) und so die Ado-3':5'-P-Produktion senken (MOREL u. JARD 1971).

Die i.a. bekanntere Ado-3':5'-P-Wirkung ist allerdings genau entgegengesetzt: Aktivierung der Na⁺-K⁺-Pumpe durch Noradrenalin (10⁻⁹ - 10⁻⁸ mol/l) $\rightarrow$ β -Rezeptorenerregung $\rightarrow$ Adenylzyklase-aktivierung $\rightarrow$ gesteigerte Ado-3':5'-P-Produktion $\rightarrow$ Aktivierung der Na⁺-K⁺-Pumpe. Wieviele Zwischenschritte ein Pfeil hierbei darstellt, ist ungeklärt. Interessanterweise wurde eine durch Ado-3':5'-P aktivierbare Membran-ATPase mit hoher Na⁺-Affinität präpariert (GACHELIN u. BASTIDE 1968).

Ebenfalls für eine Ado-3':5'-P-Mitwirkung an den Magnesiummangelerscheinungen spricht die Nachahmung der intrazellulären Kationenveränderungen (Tab. 9) durch extrazellulär zu -gesetztes Ado-3':5'-P. Ob dabei dieses zyklische Nukleotid an der Membranaußenseite angreift oder zuerst intrazellulär aufgenommen wird und dann zur Wirkung kommt, ist offen. Bei der zweiten Möglichkeit ist zu beachten, daß ein deutlicher Effekt erst bei 100 μ mol/l erfolgte, jedoch noch nicht bei 1 μ mol/l. Bei 1 μ mol/l liegt überschlägig die intrazelluläre Ado-3':5'-P-Konzentration der Yoshida-Tumorzellen, wenn man eine gleichmäßige intrazelluläre Verteilung annimmt. Eine Kompartimentierung des Ado-3':5'-P in der Zelle mit lokal höheren Konzentrationen ist aber nicht ausgeschlossen, so daß 100 μ mol/l noch im physiologischen Konzentrationsbereich liegen könnten. Eine intrazelluläre Kompartimentierung in funktionell und räumlich getrennte Ado-3':5'-P-Pools in Verbindung mit verschiedenen Rezeptor-Adenylzyklase-Systemen wird häufig diskutiert, um die experimentell gefundene Beteiligung des Ado-3':5'-P an sehr unterschiedlichen Zellfunktionen erklären zu können. Aber auch die Vorstellung, daß die verschiedenen Funktionen durch verschiedene Zellen mit jeweils nur einem spezifischen Weg vom Hormon zum Endeffekt zustande kommen, ist noch nicht

widerlegt.

Gegen eine ausgeprägte Rolle des Ado-3':5'-P an den Magnesiummangelfolgen spricht, daß Ado-3':5'-P sowohl den MGP- als auch den Aminosäure-Influx erhöht (REA u. SEGAL 1973, bzw. WEISS et al. 1972). Beides wurde im Magnesiummangel nicht gefunden. Ein weiteres Gegenargument ist, daß Magnesiummangel an der Schilddrüse zwar Mangelerkrankungen aber keine Veränderung des Ado-3':5'-P-Gehaltes hervorruft (HEATON u. HUMPHRAY 1974). Letztlich ist die Zunahme des Ado-3':5'-P-Gehaltes in den magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen sehr gering. In der Kultur fehlt ja der Einfluß sympathischer Innervation (s.ob.). Trotzdem zeigen die Kulturzellen typische Magnesiummangelerkrankungen wie Kationenveränderungen und Verminderung des Zellwachstums (Tab.8 u.12) und der Protein-synthese sowie die besprochenen Veränderungen des sonst gerade Ado-3':5'-P-abhängigen Na^+ - K^+ -Transportes (s. Abschn. 4.2. u. GÜNTHER u. AVERDUNK 1970).

Aus den vorausgegangenen Erörterungen scheint sich zu ergeben, daß mit der Veränderung des Ado-3':5'-P-Gehaltes im Magnesiummangel nur eine weitere Mangelerkrankung neben die bisher beobachteten gestellt worden ist, die je nach Ado-3':5'-P-Aufgabe im betroffenen Gewebe stärker (s. sympathische Innerv.) oder schwächer hervortritt, sonst aber nicht ausschlaggebend an der Ausbildung der Magnesiummangelerkrankungen beteiligt ist.

So bleibt die Klärung der Reaktionskette, die zu den Magnesiummangelveränderungen führt, weiteren Untersuchungen vorbehalten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. An 6-8 Tage in magnesiumarmen Suspensionskulturen mit Eagle MEM oder RPMI 1640 als Medium gewachsenen Yoshida - Ascites - Tumorzellen wurde der $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux, die (^3H)Ouabain-Bindung, die Aufnahme und Abgabe von ^{14}C - γ -Aminobuttersäure (ABS) und ^{14}C - α -Methylglukopyranosid (MGP), weiter der Zellgehalt an Calcium, Magnesium und zyklischem Adenosin-3':5'-Monophosphat (Ado-3':5'-P) sowie dessen Einfluß auf den Zellgehalt verschiedener Kationen untersucht.
2. Ein minimaler Natriumgradient verminderte die ABS-Aufnahme stärker als Magnesiummangelwachstum. Die MGP-Aufnahme wird durch den gesenkten Natriumgradient nicht beeinflusst. Die Aufnahme beider Substrate war vom pH gering, von der Temperatur stark abhängig. ABS wurde in den Yoshida-Tumorzellen 3.4 fach, MGP dagegen nicht angereichert.
3. Unter Magnesiummangel war der Natriumefflux um 30 % erhöht, während die Ouabainbindung weder in der Bindungsgeschwindigkeit noch in der Bindung pro Zelle einen Unterschied aufwies. Die Aufnahme von ABS war gering vermindert. Ihre Abgabe so wie die Aufnahme und Abgabe von MGP zeigten keine Änderung.
4. Das zelluläre Magnesium war im Magnesiummangel vermindert, der Zellgehalt an Calcium erhöht. Gleichfalls stieg der Zellgehalt an Ado-3':5'-P. Extrazellulär zugesetztes Ado-3':5'-P änderte den Zellgehalt von Na^+ , K^+ , Mg^{++} und Ca^{++} ähnlich wie Magnesiummangel, nur in geringerem Ausmaß.
5. Bei magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Ascites-Tumor-Zellen ist die Permeabilität für einige Kationen erhöht. Dies führt zur Aktivierung der magnesiumabhängigen Na^+ - K^+ -Pumpe, was aber zur Normalisierung der veränderten intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentrationen nicht ausreicht. Die geringfügige Abnahme der ABS-Aufnahme im Magnesiummangel wird auf den verringerten Na^+ -Gradienten zurückgeführt. Aus dem unveränderten passiven Transport der ABS und des MGP wird geschlossen, daß Magnesiummangel die erforderlichen Carrier nicht beeinflusst.

LITERATURVERZEICHNIS

1. J.K. ATKAWA The biochemical and cellular functions of magnesium.
In: J. DURLACH (ed.), 1. Internationales Symposium
über Magnesiummangel in der menschlichen Pathologie, Vittel 1971, S. 39-53

2. J.A. ALMENDARES & The ouabain inhibition of sugar transport of
A. KLEINZELLER kidney cortex cells.
Arch. Biochem. Biophys. 145 (1971), 511-519

3. R. AVERDUNK & Suspensionskulturverfahren für permanente Zell-
H. VOSS linien von Warmblütern.
Zbl. Bakteriolog. I Orig. 207 (1968), 265-281

4. R. AVERDUNK & Effects of mitogens on sodium-potassium transport,
P.K. LAUF ³H-ouabain binding and adenosine triphosphatase
activity in lymphocytes.
Exp. Cell. Res. 93 (1975), 331-342

5. H. BATTIFORA Effects of magnesium deficiency on blood cells,
clinical and experimental data.
In: J. DURLACH (ed.), 1. Internationales Symposium
über Magnesiummangel in der menschlichen Pathologie, Vittel 1971, S. 501-515

6. I. BIHLER & Studies on the mechanism of intestinal absorption
R.K. CRANE of sugars. I. The influence of several cations
and anions on the transport of sugars, in vitro,
by various preparations of hamster small intestine.
Biochim. Biophys. Acta 59 (1962), 78-93

7. I. BIHLER & Regulation of sugar transport in muscle: Effect
P.C. SAWH of increased external potassium in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 241 (1971), 302-309

8. A.C. BROWN Biophysics of transport across membranes.
In: T.C. RUCH & H.D. PATTON (ed.), Physiology and
Biophysics. Philadelphia & London, Saunders 1966,
S. 820-842

9. J.R. CARTER, Glucose transport in plasma vesicles from rat
J. AVRUCH & adipose tissue.
D.B. MARTIN J. Biol. Chem. 247 (1972), 2682-2688

10. R.K. CRANE Na⁺-dependent transport in the intestine and
other animal tissues.
Federat. Proc. 24 (1965), 1000-1006

11. R.K. CRANE, On the mechanism of the intestinal absorption of
G. FORSTNER & sugars. X. Effect of Na⁺ concentration on the
A. EICHHOLZ apparent Michaelis constant for intestinal
sugar transport, in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 109 (1965) 467-477

12. J.F. DANIELLI Structural factors in cell permeability and secretion.
In: Structural aspects of cell physiology.
Sympos. Soc. Exptl. Biol. 6 (1952), 1-15
13. G.R. DRAPEAU &
R.A. MacLEOD Na⁺-dependent active transport of α-aminoisobutyric acid into cells of a marine pseudomonad.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 12 (1963), 111-115
14. H. EAGLE Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science 130 (1959), 432-437
15. R.J. ELIN The effect of magnesium deficiency in mice on serum immunoglobulin concentrations and antibody plaque-forming cells.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 148 (1975), 620-624
16. R. FISCHBACH Veränderungen des Kalzium- und Magnesiumstoffwechsels bei Depressionen und Delirium tremens.
Wiener Med. Wschr. 121 (1971) 292-294
17. N. FRIEDMANN &
C.R. PARK Early effects of 3',5'-adenosine monophosphate on the fluxes of calcium and potassium in the perfused liver of normal and adrenalectomized rats.
Proc. Nat. Acad. Sci. 61 (1968), 504-508
18. G. FUCHS Mathematik für Mediziner und Biologen.
Berlin, Springer 1969
19. G. GACHELIN &
F. BASTIDE Mise en évidence de deux ATPases activées par le sodium et le potassium dans les cellules épithéliales de la vessie de grenouille.
Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 267(1968), 906
20. G.C. GAZZOLA,
R. FRANCHI,
V. SAIBENE,
R. RONCHI &
G.G. GUIDOTTI Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells.
I. Adaptive system of mediation for neutral amino acids.
Biochim. Biophys. Acta 266 (1972), 407-421
21. P. GECK Eigenschaften eines asymmetrischen Carrier-Modells für den Zuckertransport am menschlichen Erythrozyten.
Biochim. Biophys. Acta. 241 (1971), 462-472
22. P. GECK,
E. HEINZ &
B. PFEIFFER The degree and the efficiency of coupling between the influxes of Na⁺ and α-aminoisobutyrate in Ehrlich cells.
Biochim. Biophys. Acta 288 (1972), 486-491
23. M. GRACEY,
V. BURKE,
M. STORRIE &
A. OSHIN Dissociation of intestinal active sugar transport from Na⁺-K⁺-ATPase activity.
Clin. Chim. Acta 36 (1972), 555-560
24. TH. GÜNTHER &
P. MARISZ Über den K-Transport bei Mg-arm gewachsenen Zellen von E.coli.
Z. Naturforsch., 23 b (1968), 334-338

25. TH. GÜNTHER
Wasser- und Elektrolytverteilung in einigen Organen von Mg-arm ernährten Ratten.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8 (1970), 65-68
26. TH. GÜNTHER
Enzymaktivitäten in verschiedenen Rattenorganen nach Verfütterung einer Mg-Mangelkost.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8 (1970), 69-70
27. TH. GÜNTHER &
R. AVERDUNK
K-Transport und Stoffwechsel von Mg-arm gewachsenen Yoshida-Ascitestumorzellen.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8 (1970), 621-625
28. TH. GÜNTHER,
J. SCHMALBECK,
F. DORN &
H.J. MERKER
Struktur und Funktion des braunen Fettgewebes der Ratte bei Magnesiummangel.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10 (1972), 425-429
29. TH. GÜNTHER,
F. DORN &
H.J. MERKER
Embryo-toxic effects produced by magnesium deficiency in rats.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11 (1973), 87-92
30. TH. GÜNTHER,
J. SCHMALBECK &
H.J. MERKER
Gehalt des braunen Fettgewebes der Ratte an Noradrenalin und zyklischem AMP im Magnesiummangel.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11 (1973), 233-236
31. S. HÄNZE
Der Magnesiumstoffwechsel.
Stuttgart, Thieme 1962
32. F.W. HEATON &
H.P. HUMPHRAY
Effect of magnesium status on thyroid activity and iodide metabolism.
J. Endocrinol. 61 (1974), 53-61
33. E. HEINZ
Kinetic studies on the "influx" of glycine-1-¹⁴C into the Ehrlich mouse ascites carcinoma cells.
J. Biol. Chem. 211 (1954), 781-790
34. E. HEINZ
The exchangeability of glycine accumulated by carcinoma cells.
J. Biol. Chem. 225 (1957), 305-315
35. E. HEINZ &
A.H. MARIANI
Concentration work and energy dissipation in active transport of glycine into carcinoma cells.
J. Biol. Chem. 228 (1957), 97-111
36. E. HEINZ
Models of coupling of co- and counter transport and their kinetic characteristics.
In: Coupling between electrolyte and nonelectrolyte transport in cells. 11. Konferenz der Gesellschaft für biologische Chemie, Erbach, Aug. 1971.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 (1972), 11
37. E. HEINZ &
P. GECK
The efficiency of energetic coupling between Na⁺-flow and amino acid transport in Ehrlich cells - a revised assessment.
Biochim. Biophys. Acta 339 (1974), 426-431

38. H.-J. HOLTMEIER Das primäre und das sekundäre Magnesiummangel-syndrom.
In: L. HEILMEYER & H.-J. HOLTMEIER, Ernährungs-wissenschaften. V. Sympos. der Deutschen Gesell-schaft für Fortschritte auf dem Gebiet der Inn. Medizin, Freiburg, Apr. 1967.
Stuttgart, Thieme 1968, S. 111-152
39. H.-J. HOLTMEIER Die experimentelle und klinische Bedeutung von Magnesium für den Magen-Darmtrakt.
In: J. DURLACH (ed.), 1. Internationales Symposium über Magnesiummangel in der menschlichen Pathologie, Vittel 1971, S. 397-415
40. J.A. JACQUEZ & Na⁺ and K⁺ electrochemical potential gradients
J.A. SCHAFER and the transport of α -aminoisobutyric acid in Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim. Biophys. Acta 193 (1969), 368-383
41. R.M. JOHNSTONE & Amino acid transport in tumor cells.
P.G. SCHOLEFIELD III. The role of energy.
Advances Cancer Res. 9 (1965), 160-167
42. C.Y. JUNG, Glucose transport carrier activities in exten-sively washed human red cell ghosts.
L.M. CARLSON & Biochim. Biophys. Acta 241 (1971), 613-627
D.A. WHALEY
43. H.R. KABACK & Proline uptake by an isolated cytoplasmic membrane preparation of Escherichia coli.
E.R. STADTMAN Proc. Nat. Acad. Sci. 55 (1966), 920-927
44. S.J.D. KARLISH, Kinetic parameters of glucose efflux from human red blood cells under zero-trans conditions.
W.R. LIEB, Biochim. Biophys. Acta 255 (1972), 126-132
D. RAM &
W.D. STEIN
45. F. KISSMEYER-NILSON Lymphotoxic micro-technique purification of lymphocytes by flotation.
& K.E. KJERBYE In: E.S. CURTONI et al. (ed.), Histocompatibility testing. Report of a conference and workshop, Torino a.Saint-Vincent, Juni 1967.
Kopenhagen, Munksgaard 1967, 381-383
46. A. KLEINZELLER, Transport of glucose and galactose in kidney cortex cells.
J. KOLÍNSKÁ & Biochem. J. 104 (1967), 843-851
I. BENEŠ
47. A. KLEINZELLER, Transport of monosaccharides in kidney cortex cells.
J. KOLÍNSKÁ & Biochem. J. 104 (1967), 852-860
I. BENEŠ
48. J. KLIMA Cytologie.
Stuttgart, Fischer 1967
49. J. KOLÍNSKÁ Kinetics of sugar transport in rabbit kidney cortex in vitro: Movement of D-galactose, 2-deoxy-D-galactose and α -methyl-D-glukoside.
Biochim. Biophys. Acta 219 (1970), 200-209

50. H. KROMPHARDT Die Aufnahme von Taurin in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Biochem. Ztsch. 339 (1963), 233-254
51. H. KROMPHARDT, H. GROBECKER, K. RING & E. HEINZ Über den Einfluß von Alkali-Ionen auf den Glycintransport in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Biochim. Biophys. Acta 74 (1963), 549-551
52. H.D. KRUSE, E.R. ORENT & E.V. McCOLLUM Studies on magnesium deficiency in animals: Symptomatology resulting from magnesium deprivation.
J. Biol. Chem. 96 (1932), 519
53. D. LEHR Myocardic cell damage.
VI. Annual meeting of the International Study Group, Freiburg 1973
54. W.R. LIEB & W.D. STEIN Carrier and non-carrier models for sugar transport in the human red blood cell.
Biochim. Biophys. Acta 265 (1972), 187-207
55. M. LUBIN Intracellular potassium and macromolecular synthesis in mammalian cells.
Nature 213 (1967), 451-453
56. M. MAIZELS, M. REMINGTON & R. TRUSCOE Metabolism and sodium transfer of mouse ascites tumour cells.
J. Physiol. 140 (1958), 80-93
57. A. MARETZKI & M. THOM Arginine and lysin transport in sugarcane cell suspension cultures.
Biochem. 9 (1970), 2731-2736
58. S.G. MASSRY, J.W. COBURN & CH.R. KLEEMANN Evidence for suppression of parathyroid gland activity by hypermagnesia.
J. Clin. Invest. 49 (1970), 1619-1629
59. A.D. MELBOURNE & F.C. CHARALAMPOUS Energy source for active transport of α -amino-isobutyric acid in KB-cells.
J. Biol. Chem. 249 (1974), 2793-2800
60. ST.B. MIZEL & L. WILSON Nucleoside transport in Mammalian cells. Inhibition by colchicine.
Biochem. 11 (1972), 2573-2578
61. G.E. MOORE, R.E. GERNER & H.A. FRANKLIN Culture of normal human leukocytes.
J. Am. Med. Assoc. 199 (1967), 87-92
62. F. MOREL & S. JARD Cyclyc AMP and sodium transport in frog skin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 185 (1971), 351-361
63. M.A. RADCLIFFE Influence of adrenalectomy upon rat erythrocyte Na^+ and K^+ content, Na^+ efflux rate and Mg^{++} - and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{Mg}^{++}$ -ATPase activity.
Biochim. Biophys. Acta 339 (1974), 303-310

64. C. REA & ST. SEGAL Dibutyryl cyclyc adenosine monophosphate enhancement of α -methyl-D-glucoside accumulation by kidney cortex slices.
Biochim. Biophys. Acta 311 (1973), 615-624
65. K. RING Einige Aspekte des aktiven Aminosäuretransportes.
Angew. Chem. 82 (1970), 343-355
66. J.D. ROBERTSON The membrane of the living cell.
Sci. Amer. 206 (1962), 64-72
67. B.P. ROSEN Basic amino acid transport in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 246 (1971), 3653-3662
68. J.P. ROSENBUSCH, B. FLANAGAN & G. NICHOLS JR. Active transport of amino acids into bone cells.
Biochim. Biophys. Acta 135 (1967), 732-740
69. L. SACHS Angewandte Statistik.
Berlin, Springer 1974
70. J.A. SCHAFER & J.A. JACQUEZ Transport of amino acids in Ehrlich ascites cells: Competitive stimulation.
Biochim. Biophys. Acta 135 (1967), 741-750
71. J. SCHMALBECK, W.R. WILLEMS, F. DORN & TH. GÜNTHER Über den Lipidstoffwechsel im Magnesiummangel. Untersuchungen an einem Arteriosklerose-Modell.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10 (1972), 270-274
72. J. SCHMALBECK, F. DORN, H.J. MERKER & TH. GÜNTHER ^3H -Cholesterinaufnahme in verschiedene Organe von normal und Mg-arm ernährten Ratten nach intra-venöser Injektion von ^3H -Cholesterin.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10 (1972), 275-279
73. L. SCHWARTZMAN, A. BLAIR & ST. SEGAL Effect of transport inhibitors on dibasic amino acid exchange diffusion in rat kidney cortex.
Biochim. Biophys. Acta 135 (1967), 136-145
74. ST. SEGAL, L. SCHWARTZMAN, A. BLAIR & D. BERTOLI Dibasic amino acid transport in rat kidney cortex slices.
Biochim. Biophys. Acta 135 (1967), 127-135
75. A.P. SOMLYO, A.V. SOMLYO & N. FRIEDMANN Cyclyc adenosine monophosphate, cyclyc guanosine monophosphate, and glucagon: Effects on membrane potential and ion fluxes in the liver.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 185 (1971), 108-113
76. J. STOCK & S. ROSEMAN A sodium-dependent sugar co-transport system in bacteria.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 44 (1971), 132-138
77. I. TASAKI Nerve excitation. A macromolecular approach.
Springfield (Illinois), Thomas 1968

78. P.M. TERRY & G.A. VIDAVER The effect of gramicidin on the Na^+ -dependent accumulation of glycine by pigeon red blood cells. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 47 (1972), 539-543
79. W.E.C. WACKER The biochemistry of magnesium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 162 (1969), 717-725
80. M.W. WALLING, M.J. FAVUS & D.V. KIMBERG Effects of magnesium deficiency and thyroparathyroidectomy on calcium active transport by rat duodenum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148 (1975), 1038-1043
81. M. WALSER Physicochemical state of magnesium in the organism. Mechanism of maintenance of intracellular/extracellular gradient for magnesium. In: J. DURLACH (ed.), 1. Internationales Symposium über Magnesiummangel in der menschlichen Pathologie, Vittel 1971, S. 55-63
82. M. WEBB Effects of magnesium deficiency on ribosomal structure and function in certain gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 222 (1970), 416-427
83. T.E. WEICHSELBAUM An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Path., techn. sect.* 16 (1946), 40-52
84. I.W. WEISS, K. MORGAN & J.M. PHANG Cyclyc adenosine monophosphate-stimulated transport of amino acids in kidney cortex. *J. Biol. Chem.* 247 (1972), 760-764
85. R. WHANG Physiological and clinical interactions in the metabolism of magnesium and potassium. In: J. DURLACH (ed.), 1. Internationales Symposium über Magnesiummangel in der menschlichen Pathologie, Vittel 1971, S. 387-391
86. R. WHITTAM Control of membrane permeability to potassium in red blood cells. *Nature (London)* 219 (1968), 610
87. W. WILBRANDT Zuckertransporte. In: *Biochemie des aktiven Transportes*. 12. Coll. d. Gesellschaft f. Physiol. Chemie, Berlin, Springer 1961, S. 112-144
88. J.B. WILLIS The determination of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopy. II. Magnesium. *Spectrochim. Acta* 16 (1960), 273-278
89. L. WOLFINBARGER JR. & A. GIB DeBUSK An inducible amino acid transport system in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 241 (1971), 677-681

90. J.W. WOODBURY

The cell membrane: Ionic and potential gradients and active transport.
In: T.C. RUCH & H.D. PATTON (ed.), *Physiology and Biophysics*. Philadelphia & London, Saunders 1966, S. 1-25

91. H. ZUMKLEY &
H. LOSSE

Magnesium-Mangel bei endokrinen Erkrankungen und bei Nutrition Erkrankungen.
In: J. DURLACH (ed.), 1. Internationales Symposium über Magnesiummangel in der menschlichen Pathologie, Vittel 1971, S. 327-343

B A S I C - PROGRAMM

=====

FUER DIE ERRECHNUNG DER INTRAZELLULAEREN C-14-AKTIVITAET
UND KONZENTRATION VON ALPHA-METHYL-D-GLUKOPYRANOSID UND
GAMMA-AMINOBUTTERSAEURE.

RECHNER	:	2100 A COMPUTER
TERMINAL	:	TELEPRINT 390
LOCHSTREIFENSTANZER	:	8100 A TAPE PUNCH
LOCHSTREIFENLESEH, OPT.:	:	2748 A TAPE READER

ALLE GENANNTEH GERAEETE VON DER FA. HEWLETT-PACKARD

```
1
PRINT "ANTWORT JA=1,NEIN=0"
PRINT "P-WAHL: END=0,R=1(MIT LOCHSTR.=7),F6=2,XQ=3,F3=4,REGRESS.=6";
INPUT M3
GOSUB 9000
IF M3=2 THEN 700
IF M3=3 THEN 1010
IF M3=0 THEN 9999
IF M3=4 THEN 15
IF M3=5 THEN 320
IF M3=6 THEN 2010
PRINT
PRINT "VERSUCH";
INPUT Z1
PRINT
PRINT "EINGABE B1,B2,F1";
INPUT B1,B2,F1
LET M2=0
PRINT "F2 UNVERAEND.";
INPUT X1
IF X1=0 THEN 32
LET F2=.5842
GOTO 34
PRINT "EINGABE F2";
INPUT F2
IF M2=1 THEN 270
PRINT "F3,4,5,6 UNVERAEND.";
INPUT Z
IF Z=0 THEN 120
PRINT "MIT STG";
INPUT M4
LET F3=.2075
LET F4=.8858
LET F5=1.047
LET F6=.5
GOTO 140
PRINT "EINGABE F3,4,5,6";
INPUT F3,F4,F5,F6
LET N=0
PRINT "TCE=KONST.";
INPUT Y
IF Y=0 THEN 210
LET T=F5*500
GOTO 220
LET N=1
LET O=0
PRINT "C2=KONST.";
INPUT X
IF X=0 THEN 295
PRINT "EINGABE C2";
INPUT C2
IF M2=1 THEN 320
IF N=1 THEN 308
GOTO 301
LET O=1
IF N=1 THEN 308
LET M=0
PRINT "SFG=KONST.";
INPUT Q
IF Q=0 THEN 308
PRINT "EINGABE SFG";
INPUT C3
```

```
LIST 307
307 GOTO 310
308 LET M=1
310 LET F1=F1*F6
320 LET K2=F3/F2
325 LET K1=F2*F5
327 PRINT "EINGABE U0 IN CPM/NMOL";
328 INPUT U0
330 IF N=1 THEN 340
331 IF M=1 THEN 335
332 IF O=1 THEN 370
333 GOTO 360
335 GOTO 350
340 IF O=1 THEN 445
345 GOTO 470
350 IF O=1 THEN 395
355 GOTO 420
360 PRINT " EINGABE C1"
362 LET M1=1
364 INPUT C1
366 IF C1=0 THEN 560
368 GOTO 485
370 PRINT "EINGABE C1,2"
375 LET M1=2
380 INPUT C1,C2
385 IF C1=0 THEN 560
390 GOTO 485
395 PRINT "EINGABE C1,SFG,C2"
397 LET N2=5
398 IF M3=7 THEN 4000
400 LET M1=3
405 INPUT C1,C3,C2
410 IF C1=0 THEN 560
415 GOTO 485
420 PRINT "EINGABE C1,SFG"
425 LET M1=4
430 INPUT C1,C3
435 IF C1=0 THEN 560
440 GOTO 485
445 PRINT "EINGABE C1,SFG,TCE,C2"
447 LET N2=6
448 IF M3=7 THEN 4000
450 LET M1=5
455 INPUT C1,C3,T,C2
460 IF C1=0 THEN 560
465 GOTO 485
470 PRINT "EINGABE C1,SFG,TCE"
475 LET M1=6
480 INPUT C1,C3,T
482 IF C1=0 THEN 560
485 IF M3=4 THEN 650
486 IF M4=1 THEN 493
490 LET R=(F4*(C1-B1)*(T/(C3*K1)+K2+1)/(C2-B2)-F1-K2)/(1-F1)
492 GOTO 510
493 LET R=(F4*(C1-B1)/(C2-B2)*T/(C3*K1)-F1-K2)/(1-F1)
510 LET S2=(C2-B2)/100
520 LET S1=R*S2
530 PRINT TAB(5);"R=";R;TAB(25);"SI=";S1;TAB(45);"SE=";S2
540 IF M1=1 THEN 364
542 IF M1=2 THEN 380
544 IF M1=3 THEN 405
546 IF M1=4 THEN 430
54
STOP
```

READY

```
548
IF M1=5 THEN 455
IF M1=6 THEN 480
PRINT "F2,C2 AEND=1,P-AEND=2";
INPUT M2
IF M2=1 THEN 27
IF M2=2 THEN 2
LET F3=(C1-B1)/(C2-B2)*F4*T/(C3*F5)-(F1*F2)
PRINT "F3=";F3
GOTO 540
PRINT "F1";
INPUT F1
LET F=.839535
LET F2=.5842
LET F3=.2075
PRINT "B1,B2"
INPUT B1,B2
PRINT "C1,SFG,T,C2"
INPUT C1,C3,T,C2
IF C1=0 THEN 2
LET W=((C1-B1)*T*F*100)/((C2-B2)*C3)
LET U=W-(F3*100)
LET V=F2*F1*100
LET X=U/V
PRINT "F6=";X;TAB(15);"WIT=";U;TAB(30);"WIT'=";V;TAB(45);"W0=";W
GOTO 780
REM MITTELWERT, STANDARDABWEICHUNG, VARIATIONSKOEFFIZIENT,
REM STICHPROBENUMFANG
PRINT
PRINT "EINGABE X (KORR=0, EING-END=-1, P-AEND=-2)"
LET I=1
LET Q=A1=0
PRINT I;
INPUT X[I]
IF X[I]=-2 THEN 2
IF X[I]=-1 THEN 1100
IF X[I]=0 THEN 1050
LET I=I+1
GOTO 1020
PRINT "KORR: NR DES FALSCHEN X, NEUES X";
INPUT N,A
IF A=0 THEN 1085
LET X[N]=A
GOTO 1020
LET X[N]=X[I-1]
LET I=I-1
GOTO 1020
IF I=1 THEN 1102
GOTO 1105
PRINT "ZU WENIG X-WERTE, NEUE P-WAHL"
PRINT
GOTO 2
LET I=I-1
FOR I1=1 TO I
LET Q=Q+X[I1]
NEXT I1
LET Q=Q/I
FOR K=1 TO I
LET A1=A1+(X[K]-Q)^2
NEXT K
LET S=SQR(A1/(I-1))
PRINT "XQ=";Q;TAB(15);"S=";S;TAB(30);"VK=";S*100/Q;TAB(45);"N=";I
GOTO 1015
```

```

LIST 2000
2000 REM *REGRESSION VON Y AUF X, X AUF Y MIT KORRELATIONSKOEFF.
2001 REM *AUSDRUCK: N, XQ, YQ, B-YX+-S, B-XY+-S, A, R+-S
2010 LET U9=1
2015 LET Q1=Q2=Q3=Q4=Q5=G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7=G8=0
2020 PRINT "EINGABE X,Y (KORR=-1, EING-END=-2)"
2023 LET I=1
2025 PRINT I;
2030 INPUT X[I],Y[I]
2035 IF X[I]=-1 THEN 2055
2040 IF X[I]=-2 THEN 2105
2045 LET I=I+1
2050 GOTO 2025
2055 PRINT "KORR: NR DES FALSCHEN XY, NEUES X, NEUES Y";
2060 INPUT N1,A2,A3
2065 IF A2=0 THEN 2085
2070 LET X[N1]=A2
2075 LET Y[N1]=A3
2080 GOTO 2025
2085 LET X[N1]=X[I-1]
2090 LET Y[N1]=Y[I-1]
2095 LET I=I-1
2100 GOTO 2025
2105 IF I=2 THEN 2
2110 LET I=I-1
2115 LET Q1=Q2=Q3=Q4=Q5=Q6=G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7=G8=G9=G0=0
2220 FOR I1=1 TO I
2225 LET Q1=Q1+X[I1]
2230 LET Q2=Q2+Y[I1]
2235 NEXT I1
2240 LET Q1=Q1/I
2245 LET Q2=Q2/I
2250 FOR I1=1 TO I
2255 LET Q3=Q3+(X[I1]-Q1)^2
2260 LET Q4=Q4+(Y[I1]-Q2)^2
2265 LET Q5=Q5+((X[I1]-Q1)*(Y[I1]-Q2))
2270 NEXT I1
2275 LET G1=Q5/Q3
2280 LET G2=SQR((Q4-G1*Q5)/(I-2)/Q3)
2285 LET G3=Q2-G1*Q1
2290 LET G4=Q5/Q4
2295 LET G5=SQR((Q3-G4*Q5)/(I-2)/Q4)
2300 LET G6=Q1-G4*Q2
2304 LET G7=G1*G4
2306 LET G8=SQR((1-G7^2)/(I-2))
2308 LET G9=G2*SQR(Q3)
2310 PRINT TAB(5);"N=";I;TAB(16);"XQ=";Q1;TAB(34);"YQ=";Q2
2320 PRINT TAB(5);"REGRESS.YX A=";G3;TAB(35);"B=";G1;"+";G2
2321 PRINT TAB(10);"S(Y.X)^2=";G9^2;TAB(32);"Q(X)=";Q3
2322 PRINT TAB(5);"REGRESS.XY A=";G6;TAB(35);"B=";G4;"+";G5
2325 PRINT TAB(5);"R=";G7;"+";G8
2327 IF U9=0 THEN 2329
2328 GOTO 2330
2329 RETURN
2330 PRINT "END=0,NEU=1,WEITER YX=2,XY=3"
2335 INPUT M5
2340 IF M5=0 THEN 2
2342 IF M5=1 THEN 2345
2344 GOTO 2350
2345 IF U9=0 THEN 4650
2348 GOTO 2015
2350 PRINT "EINGABE X=0,Y=1,P-AEND=2"
2355 INPUT M6
2360 IF M6=1 THEN 2380
2365 IF M6=2 THEN 2330
237
STOP

```

```

2370
INPUT X
IF M5=3 THEN 2425
GOTO 2405
INPUT Y
IF M5=3 THEN 2415
PRINT "X=";(Y-G3)/G1
GOTO 2350
PRINT "Y=";X*G1+G3
GOTO 2350
PRINT "X=";Y*G4+G6
GOTO 2350
PRINT "Y=";(X-G6)/G4
GOTO 2350
REM BERECHNUNG BEIM DATEN-EINLESEN MIT LOCHSTREIFEN
REM DABEI IST: L2= FORTLAUFENDE NR, L(L2)=ZEIT IN MIN,
REM S(L2)=S(I) IN CPM/MIKRO-L, T(L2)=S(I) IN MMOL/L,
REM Q(L2)=S(E) IN CPM/MIKRO-L, U(L2)=S(E) IN MMOL/L,
REM R(L2)=R=S(I)/S(E).
GOSUB 5000
LET U2=0
PRINT "NR";TAB(7);"ZEIT";TAB(27);"S(I)";TAB(55);"S(E)"
PRINT TAB(7);"MIN";TAB(19);"CPM/MIKRO-L";TAB(31);"MMOL/L";
PRINT TAB(46);"CPM/MIKRO-L";TAB(59);"MMOL/L"
FOR L2=1 TO L1
LET C1=M[L2]
LET C2=N[L2]
LET C3=O[L2]
IF N2=5 THEN 4110
LET T=P[L2]
LET U1=(C2-B2)
LET R=(F4*(C1-B1)*(T/(C3*K1)+K2+1)/U1-F1-K2)/(1-F1)
LET R[L2]=R
IF U2=1 THEN 4240
GOTO 4250
RETURN
LET Q[L2]=U1/100
LET S[L2]=R*Q[L2]
LET T[L2]=S[L2]/U0
LET U[L2]=Q[L2]/U0
PRINT L2;L[L2];TAB(19);S[L2];TAB(31);T[L2];TAB(46);Q[L2];TAB(59);
PRINT U[L2]
NEXT L2
PRINT
PRINT
PRINT "NR";TAB(7);"ZEIT";TAB(19);"R=S(I)/S(E)"
PRINT TAB(7);"MIN"
FOR L3=1 TO L1
LET L2=L3
LET U2=1
GOSUB 4070
PRINT L2;L[L2];TAB(19);R[L2]
NEXT L3
PRINT
PRINT "END=0, P-AEND=1, V=S(I)/T =2";
INPUT U3
PRINT
IF U3=0 THEN 9999
IF U3=1 THEN 2
PRINT
PRINT "V VON NR A BIS NR B, EINGABE A,B";
INPUT U4,U5
PRINT " V IN CPM/MIKRO-L/MIN (=1), IN MMOL/L/MIN (=2), ODER IN";

```

```
LIST 4675
4675 PRINT " R/MIN (=3)";
4680 INPUT U6
4682 PRINT
4685 LET I=1
4690 FOR U7=U4 TO U5
4700 LET X[I]=L[U7]
4710 IF U6=1 THEN 4740
4720 IF U6=3 THEN 4745
4730 GOTO 4750
4740 LET Y[I]=S[U7]
4742 GOTO 4755
4745 LET Y[I]=R[U7]
4747 GOTO 4755
4750 LET Y[I]=T[U7]
4755 LET U9=0
4760 LET I=I+1
4770 NEXT U7
4775 GOSUB 2105
4777 PRINT
4780 IF U6=1 THEN 4800
4790 IF U6=2 THEN 4810
4795 IF U6=3 THEN 4815
4800 PRINT "B(YX)= V IN CPM/MIKRO-L/MIN !"
4805 GOTO 4820
4810 PRINT "B(YX)= V IN MMOL/L/MIN !"
4812 GOTO 4820
4815 PRINT "B(YX)= V IN R/MIN !"
4820 PRINT
4825 PRINT "END=0, P-AEND=1, WEITER V,R,T =2, NEU=3";
4830 INPUT U8
4840 IF U8=0 THEN 9999
4845 IF U8=1 THEN 2
4850 IF U8=2 THEN 4870
4855 IF U8=3 THEN 4650
4860 GOTO 4825
4870 LET U6=0
4880 GOTO 2330
4990 REM DATEN MIT LOCHSTREIFEN EINLESEN
5000 LET N3=-1
5060 LET L1=1
5100 CALL (1,K[1],N2,N3)
5110 IF K[N2]=0 THEN 5100
5120 IF K[1]=-1 THEN 5200
5130 LET L[L1]=K[1]
5140 LET M[L1]=K[2]
5150 LET O[L1]=K[3]
5155 IF N2=5 THEN 5175
5160 LET P[L1]=K[4]
5165 LET N[L1]=K[5]
5170 GOTO 5180
5175 LET N[L1]=K[4]
5180 LET L1=L1+1
5190 GOTO 5100
5200 LET L1=L1-1
5210 RETURN
9000 DIM X[200],Y[100]
9050 DIM K[6],L[120],M[25],N[25],O[25],P[25]
9100 DIM Q[25],R[25],S[25],T[25],U[25]
9500 RETURN
9999 END
```

READY

ES PROGRAMM ERRECHNET DIE INTRA- UND EXTRAZELLULÄREN KONZENTRATIONEN SI UND SE UND IHR VERHÄLTNISS ALS MASS DER EXTRAZELLULÄREN ANREICHERUNG FÜR PROBEN-ENTNAHMEN AUS EINER FLUXMESSUNG NACH DER ANGEgebenEN METHODE (SIEHE 2.2.4. U. 5.) UND DIE ENTSPRECHENDE TRANSPORTGESCHWINDIGKEIT V. DAS PROGRAMM WURDE MIT DER ZEIT ERWEITERT UND JEWELCHE METHODE FÜR DIE ENTWICKLUNG ANGEFASST. DAHER KÖNNEN DIE KONZENTRATIONEN SI UND SE VON ANDEREN BASISDATEN AUSGEHEND ERRECHNET WERDEN. DARAUF KANN HIER NICHT WEITER EINGEGANGEN.

ABFORDERUNG DES PROGRAMMS:

```

- 660      ERRECHNUNG VON SI, SE R
- 1200     STICHPROBENPARAMETER AUS UNGRUPPIERTEN X-WERTEN
- 2430     PARAMETER DER LINEAREN REGRESSION AUS X,Y-WERTENPAAREN
- 4880     DATEN AUFLISTEN, TRANSPORTGESCHWINDIGKEIT ERRECHNEN
- 9500     LOCHSTREIFEN EINLESEN
          ENDE

```

VERSUCHSDATEN WERDEN UNABHÄNGIG VON DER MÖGLICHEN VERMESSUNGSZEIT DES RECHNERS ÜBER EIN TELEPRINT AUF LOCHSTREIFEN ABGELESEN. EINE ZEILE ENTHÄLT DABEI ALLE NOTIGEN MESSDATEN FÜR EINZIGEN PROBENENTNAHME WÄHREND DER FLUXMESSUNG ZU EINER BESTIMMTEN ZEIT.

DIE ANFOLGE DER REIHE INNERHALB EINER ZEILE SIEHE UNTEN.

EINE ZEILE WIRD MIT EINER 1 ABGESCHLOSSEN.

DIE EINGABE ALLER DATEN WIRD ALS ENDE-BEDINGUNG -1 ALS ERSTE INFORMATION IN DER LETZEN ZEILE EINGEGEBEN.

1. DATEN FÜR VERSUCH 74 II, ABS-AUFNAHME, MG-ARME ZELLEN

1. CPM-SED, FEUCHTGEW., TCE-GEW., CPM-UEBST.

```

,1952.6,49.1,506.4,63318.6,1
,1996.2,47.9,503.7,63318.6,1
2383.6,49.8,499.5,63318.6,1
2762.2,55.2,517.8,63318.6,1
2448.4,51.2,509.4,63318.6,1
3494.52.8,502.8,63318.6,1
3162.50.3,497.4,63318.6,1
2610.8,45.7,519.4,63318.6,1
1,2921.8,44.3,515.6,63318.6,1
1,3078.6,45.503.7,63318.6,1
1,3073.45.4,502.1,63318.6,1
1,1,1,1,1

```

SOLL EIN ZEILE WEGEN FEHLERHAFTER EINGABE ETC. NICHT GELESEN WERDEN, SO WIRD STATT 1 ALS ENDEBEDINGUNG 0 VERWENDET.

DAS PROGRAMM LAEUFT IM DIALOGSYSTEM AB.
UM ARBEITSZEIT ZU SPAREN, WERDEN ABKUERZUNGEN BENUTZT.
ES BEGINNT MIT DER WAHL DES SPEZIELLEN PROGRAMMS:

RUN
ANTWORT JA=1, NEIN=0
P-WAHL: END=0, R=1 (MIT LOCHSTR.=7), F6=2, XQ=3, F3=4, REGRESS.=6?7

VERSUCH? 74 II, ABS-AUFNAHME, MG-ARME ZELLEN, 11.9.1972

EINGABE B1,B2,F1?22.4,22.4,0.1

F2 UNVERAEND.?0

EINGABE F2?0.5825

F3,4,5,6 UNVERAEND.?1

MIT STG?1

TCE=KONST.?0

C2=KONST.?0

EINGABE U0 IN CPM/MMOL?5149.4

EINGABE C1,SFG,TCE,C2

(JETZT WIRD VOM LOCH-
STREIFEN EINGELESEN.)

NR	ZEIT MIN	(S)I		(S)E	
		CPM/MIKRO-L	MMOL/L	CPM/MIKRO-L	MMOL/L
1	5.2	33.7008	6.54461E-03	632.962	.122920
2	5.2	46.6717	9.06352E-03	632.962	.122920
3	10	91.4266	1.77548E-02	632.962	.122920
4	10	122.270	2.37445E-02	632.962	.122920
5	10	98.3628	1.91018E-02	632.962	.122920
6	20	234.773	4.55923E-02	632.962	.122920
7	20	204.002	3.96167E-02	632.962	.122920
8	20	179.109	3.47824E-02	632.962	.122920
9	30.1	244.668	4.75139E-02	632.962	.122920
10	30.1	252.354	4.90064E-02	632.962	.122920
11	30.1	245.152	4.76079E-02	632.962	.122920

NR	ZEIT MIN	R=(S)I/(S)E
1	5.2	5.32430E-02
2	5.2	7.37355E-02
3	10	.144442
4	10	.193171
5	10	.155410
6	20	.370911
7	20	.322297
8	20	.282970
9	30.1	.386545
10	30.1,,,,	.398688
11	30.1	.387310

END=0, P-AEND=1, V=(S)I/T =2?2

V VON NR A BIS NR B, EINGABE A,B?1,11

V IN CPM/MIKRO-L/MIN (=1), IN MMOL/L/MIN (=2), ODER IN R/MIN (=3)?2

N= 11 XQ= 17.3364 YQ= 3.09389E-02
REGRESS.YX A= 3.56883E-03 B= 1.57877E-03 +- 1.57322E-04
 S(Y.X)12= 2.39103E-05 Q(X)= 966.066
REGRESS.XY A=-.652851 B= 581.442 +- 57.9398
R= .917963 +- .132222

YX)= V IN MMOL/L/MIN !

D=0, P-AEND=1, WEITER V,R,T =2, NEU=3?0

ADY

AUCH DIE MANUELLE DATEN-EINGABE UND IHRE BERECHNUNG IST MOEGLICH.

Z.B.

RUN

ANTWORT JA=1,NEIN=0

P-WAHL: END=0,R=1(MIT LOCHSTR.=7),F6=2,XQ=3,F3=4,REGRESS.=6?1

VERSUCH? 74 II, ABS-AUFNAHME, MG-ARME ZELLEN, 11.9.1972

EINGABE B1,B2,F1?22.4,22.4,0.1

F2 UNVERAEND.?0

EINGABE F2?0.5825

F3,4,5,6 UNVERAEND.?1

MIT STG?1

TCE=KONST.?0

C2=KONST.?1

EINGABE C2?63318.6

EINGABE U0 IN CPM/NMOL?5149.4

EINGABE C1,SFG,TCE

?1952.6,49.1,506.4

R= 5.32430E-02

SI= 33.7008

SE= 632.962

?1996.2,47.9L503.7

R= 7.37355E-02

SI= 46.6717

SE= 632.962

? USW. STOP

STOP

READY

EBENSO KOENNEN MITTELWERT(XQ), STANDARDABWEICHUNG(S), VARIATIONS-KOEFFIZIENT(VK) UND STICHPROBENUMFANG BERECHNET WERDEN.

Z.B.

RUN

ANTWORT JA=1,NEIN=0

P-WAHL: END=0,R=1(MIT LOCHSTR.=7),F6=2,XQ=3,F3=4,REGRESS.=6?3

EINGABE X (KORR=0, EING-END=-1, P-AEND=-2)

1 ?33.7008

2 ?46.69

3 ?0

KORR: NR DES FALSCHEN X, NEUES X?2,46.6717

3 ?-1

XQ= 40.1862

S= 9.17181

VK= 22.8233

N= 2

1 ?91.4266

2 ?122.27

3 ?98.3628

4 ?-1

XQ= 104.02

S= 16.1812

VK= 15.5558

N= 3

1 ? (USW.) -2

P-WAHL: END=0,R=1(MIT LOCHSTR.=7),F6=2,XQ=3,F3=4,REGRESS.=6?0

READY

EIN WEITERES, EBENFALLS FUER SICH ALLEIN BENUTZBARES PROGRAMM
IST DIE BERECHNUNG DER PARAMETER EINER REGRESSIONSGERADE.
DIESER PROGRAMM-TEIL WIRD AUCH ALS UNTERPROGRAMM BEI DER
BERECHNUNG DER TRANSPORT-GESCHWINDIGKEIT v (S. 08BEN) VERWENDET.

Z.B.

RUN
ERROR 3 IN LINE 9999

RUN
ANTWORT JA=1, NEIN=0
P-WAHL: END=0, R=1 (MIT LOCHSTR.=7), F6=2, XQ=3, F3=4, REGRESS.=6?6
EINGABE X, Y (KORR=-1, EING-END=-2)

1 75.2, 6.54461
2 75.2, 9.06352
3 710, 17.7548
4 710, 23.7445
5 710, 19.1018
6 720, 45.5923
7 720, 39.6162
8 720, 34.7824
9 720, 475139
10 7-1, -1

KORR: NR DES FALSCHEN XY, NEUES X, NEUES Y?9, 30.1, 47.5139

10 730.1, 49.0064
11 730.1, 47.6079
12 7-2, -2

N= 11	XQ= 17.3364	YQ= 30.9339	
REGRESS.YX A= 3.56883	B= 1.57877	+- .157322	
S(Y,X) 1/2= 23.9103	Q(X)= 966.066		
REGRESS.XY A=-.652851	B= .581442	+- 5.79398E-02	
R= .917963	+- .132222		

END=0, NEU=1, WEITER YX=2, XY=3
?0

P-WAHL: END=0, R=1 (MIT LOCHSTR.=7), F6=2, XQ=3, F3=4, REGRESS.=6?0

READY

VERWENDETE FORMELN S. BERECHNUNGEN .

HP-65 Program Form

Title Anreicherung $R = (S_i / (S_e)) \cdot (S_i) / (S_e)$ Page 1 of 10

SWITCH TO W/PRGM PRESS [F1] PRGM | TO CLEAR MEMORY

KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	REGISTERS
LBL	23	EINGABE	LBL	23	EINGABE	R1 $\frac{VF}{m}$
A	11	Cpm - Background	D	14	Cpm - Sediment	R2 B
STO 2	33 02		RCL 2	34 02		R3 C1-B
R/S	84	Zählrate toter Zellen	-	51		R4 G2-B
2	02		STO 3	33 03		R5 F1/S
÷	81		RTN	24		R6 F2
STO 5	33 05		LBL	23	EINGABE	R7 T
6	06		E	15	mg Sedim. feuchtgew	R8 K2
0	00		RCL 7	34 07		R9 F4
0	00		g x 2 y	35 07		
STO 7	33 07	$T = \mu l \text{ TCE-Volumen}$	÷	81	T/C3	
.	83	wenn konstant	RCL 6	34 06	$T(C3 \cdot F2)$	
2	02		÷	81	$T(C3 \cdot F2)$	
0	00		RCL 8	34 08		
7	07		+	61	$T(C3 \cdot F2) + K2$	
5	05		1	01	T	
↑	41	ew-Rate = F3	+	61	$T \cdot F2 + K2 + 1$	
.	83		RCL 3	34 03		
5	05		x	21	$(C3 \cdot F2 + K2 + 1)(C1-B) = Z$	
10 8	08		RCL 4	34 04		
4	04		9	09		
2	02		x	21	$Z \cdot F4$	
STO 6	33 06	12R-Rate = F2	RCL 4	34 04		
÷	81		=	81	$Z \cdot F4 / (C2-B)$	
STO 8	33 08	$K2 = F3 / F2$	RCL 5	34 05		
.	83		-	51	$Z \cdot F4 / (C2-B) - F1$	
8	08		RCL 8	34 08		
8	08		-	51	$Z \cdot F4 / (C2-B) - F1 - K2 = Z$	
5	05		1	01		
10 8	08		RCL 5	34 05		
STO	33	$F4 = \text{Volumenverlust-}$	-	51		
9	09	rate beim Ausathern	=	81	$Z' / (C1 - F1) = R$	
0	00	0.16 A fertig	R/S	84	$R = (S_i) / (S_e)$	
RTN	24		RCL 4	34 04		
LBL	23	EINGABE	1	01		
B	12	mg TCE, wenn varos	0	00		
1	01		0	00		
.	83		÷	81		
0	00		x	21		
10 4	04		10 R/S	84	$(S_i) \text{ in Cpm}/\mu l$	
7	07	Spez. Dichte von	RCL 1	34 01		
÷	81	10 %ig TCE	g L X	35 00		
STO 7	33 07		g L X	35 08		
RTN	24		÷	81		
LBL	23	EINGABE	R/S	84	$(S_e) \text{ in mmol/l}$	
C	13	Cpm - Überstand	↑	35 09		
RCL 2	34 02		R/S	84	$(S_e) \text{ in Cpm}/\mu l$	
-	51		RCL 1	34 01		
STO 4			-	81		
10 RTN			10 RTN	24	$(S_e) \text{ in mmol/l}$	

LABELS
A B, F1
B T
C C2
D C1
E C3, R
0 $S_i \text{ Cpm}/\mu l$
1 " mmol/L
2 $S_e \text{ Cpm}/\mu l$
3 " mmol/L
4
5
6
7
8
9

FLAGS
1
2

Beispiel zu P 10

Versuch Nr. 82, MGP-Abgabe, Normale Zellen, 5.3.74

Zeit, Cpm-Sed., Feuchtgewicht, Cpm-Überstand

1.25, 4375.8, 41, 3264.9

1.25, 3773.2, 34.8, 3264.9

usw.

Nach Programm-Bedienungsanleitung eingeben:

UF	=	714.29	Cpm/nmol	konst.i.Versuch
B	=	42.4	Cpm	"
F1	=	0.1633	tote/lebende Zellen	"
T	=	entfällt, da nicht ausgewogen.		

C2	=	3 264.9	Cpm	variabel i.Vers.
C1	=	4 375.8	"	"
C3	=	41	mg	"

Ergebnisse:

R	=	33.7735		
(S) _i	=	1 088.35	Cpm/ μ l	bzw. 1.52326 mmol/l
(S) _e	=	32.2251	"	" 0.0451021 "

Für 3773.2 (s.ob.) mit STEP 6 Berechnung fortsetzen.

C2 erst wieder neu eingeben, wenn sich der Wert ändert.

HP-65 Program Form

Title Stichprobenparameter $n, \bar{x}, s, 2s, 3s, VK\%, s^2, s_x, \hat{t}$ Page 1 of 1

SWITCH TO W/PRGM PRGSS [1] PRGM | TO CLEAR MEMORY

KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	REGISTERS
0	00	Speicher löschen	X	71	SS	R1 n
STD 1	3301	Für neue Stichprobe	R/S	84		
STD 2	3302		LBL	23		R2 $\sum x_i$
STD 3	3303		D	14		
STD 4	3304		C	13		R3 $\sum x_i^2$
R/S	84		B	12		
LBL	23	Eingabe	÷	81		R4 s^2
A	11	x_i - Werte	I	01		
STD	33		O	00		
+	61		00	00		
2	02	$x_i + \sum x_i$	X	71	$VK\% = S \cdot 100 / \bar{x}$	R5
F-1	32		R/S	84		
TR	09		RCL 4	3404	s^2	R6
STD	33		R/S	84		
+	61	$x_i^2 + \sum x_i^2$	C	13		R7
3	03		RCL 1	3401		
RCL 1	3401		F	31		R8
I	01		TR	09		
+	61		÷	81	$s_{\bar{x}} = S / \sqrt{n}$	R9
STD 1	3301	$1 + n$	R/S	84		
RTN	24		B	12		
LBL	23		g x ÷ y	3502	$\hat{t} = \bar{x} / s_{\bar{x}}$	
B	12		÷	81		
RCL 2	3402		RTN	24		
RCL 1	3401		LBL	23	EINGABE	
÷	81	$\bar{x} = \sum x_i / n$	E	15	falsches x_i zur	
RTN	24		STD	33	Korrektur	
LBL	23		-	51		
C	13		2	02	$-x_i + \sum x_i$	
RCL 3	3403		HO F-1	32		
RCL 2	3402		TR	09		
F-1	32		STD	33		
TR	09		-	51		
RCL 1	3401		3	03	$-x_i^2 + \sum x_i^2$	
÷	81		RCL 1	3401		
-	51		I	01		
RCL 1	3401		-	51		
I	01		STD 1	3301	$n - 1$	
-	51		RTN	24		
HO ÷	81					
STD 4	3304	$s^2 = [\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / n] / (n-1)$				
F	31					
TR	09	$s = \sqrt{s^2}$				
RTN	24					
2	02					
X	71	2s				
R/S	84					
I	01					
.	83					
50 5	05					

LABELS
 A Emp. x_i
 B $\bar{x}$
 C $s, 2s, 3s$
 D VK, s^2, s_x, t
 E x_i Korrektur

FLAGS

1

2

Beispiel zu P 1

Versuch Nr. 82, MGP-Abgabe, normale Zellen, 5.3.74

$(S)_1$ in Cpm/ μ l zur Inkubationszeit 1.25 min:

$$x_1 = 1088.35$$

$$x_2 = 1095.48$$

$$x_3 = 1077.86$$

Nach Programm-Bedienungsanleitung eingeben:

Ergebnisse:

$$n = 3$$

$$\bar{x} = 1087.23$$

$$\pm s = 8.86321$$

$$2s = 17.7264$$

$$3s = 26.5896$$

$$VK \% = 0.81521$$

$$s^2 = 78.5565$$

$$s_{\bar{x}} = 5.11718$$

$$\hat{t} = 212.467$$

$$t_{v, \alpha_G} = t_{2, 0.001} = 31.6 \text{ laut Tabelle,}$$

dh.: $\hat{t} > t_{\alpha_G}$, also ist $\bar{x}$ signifikant
von 0 verschieden ($\hat{=} P < 0.001$).

Falls gewünscht können $\sum(x_i)$ mit RCL 2

und $\sum(x_i^2)$ mit RCL 3 abgerufen werden.

$$\text{In diesem Fall} \quad \text{RCL 2} = 3261.690000$$

$$\text{RCL 3} = 3546364.333$$

HP-65 Program Form

Titel Lineare Regression, Eingabe mit Corr. Page 1 of 3

SWITCH TO W-PRGM PHF55 [X] PRGM | TO CLEAR MEMORY

KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	REGISTERS
LBL	23	Eingabe Korrektur	GTO	22		R1 n
A	11	auswechseln:		01		
F-1	32	Flag 1 out	RTN	24		R2 $\sum x$
SF1	51		LBL	23	Grundwert und	
LBL	23	EINGABE	C	13	Korrelation mit	R2 $\sum x$
1	01	x _i -Wert	RCL	34	Standardabweichung	R3 $\sum x^2$
STO	33		9	09		
+	61		RCL2	3402		
2	02	$\sum x$	RCL4	3404		
F-1	32		X	71		R4 $\sum y$
YX	09		RCL1	3401		
D	14		-	81		
STO	33		-	51	$Q_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}$	R5 $\sum y^2$
+	61		STO8	3308		
3	03	$\sum x^2$	RCL5	3405		
gLSX	3500		RCL4	3404		R6 Q_y
R/S	84	EINGABE	F-1	32		
x	71	y _i -Wert	YX	09		
STO	33		RCL1	3401		R7 Q_x
+	61		-	81		
9	09	$\sum x \cdot y$	-	51	$Q_y = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$	R8 Q_{xy}
gLSX	3500		STO6	3306		
D	14		RCL3	3406		
STO	33		RCL2	3402		
+	61		F-1	32		
4	04	$\sum y$	YX	09		R9 $\sum x \cdot y$
F-1	32		RCL1	3401		
YX	09		-	81		
D	14		-	51	$Q_x = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$	
STO	33		STO7	3307		LABELS
+	61		1	01		A xy Eing.
5	05	$\sum y^2$	RCL8	3408		B
RCL1	3401		RCL7	3407		C Grundwerte
1	01		RCL6	3406		D Corr.
D	14		x	71		E Eing.korr.
+	61		f	31		0
STO1	3301	n	YX	09		1
RTN	24		-	81	$r = Q_{xy} / \sqrt{Q_x \cdot Q_y}$	2
LBL	23		R/S	84		3
D	14		F-1	32		4
F	31		YX	09		5
TF1	61		-	51		6
CHS	42		RCL1	3401		7
gNGP	3501		2	02		8
RTN	24		-	51		9
LBL	23	EINGABE-BEGINN	-	81		FLAGS
E	15	x, falsch zur	f	31		1 on: Zur
F	31	Korrektur:	YX	09	$S_p = \sqrt{(1-r^2)/(n-2)}$	Korr.
SF1	51	Flag 1 on	RTN	24		2
CHS	42					

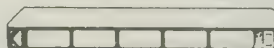
HP-65 Program Form

Title Linear Regression, Ergebnisse Page 2 of 3

SWITCH TO W/PRGM PRESS [1] PRGM | TO CLEAR MEMORY

KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	REGISTERS
LRL	23		B	12		R1 n
A	11		A	11		
RCL 2	34 02		F	31		
RCL 1	34 01		TFI	61		R2 Σx
-	81	$\bar{x} = \Sigma x / n$	$\Sigma x \Sigma y$	35 07		
RTN	24		Σx^2	35 01		R3 Σx^2
LRL	23		RCL 8	34 08		
B	12		RCL 7	34 07		
RCL 4	34 04		F	31		
RCL 1	34 01		TFI	61		R4 Σy
-	81	$\bar{y} = \Sigma y / n$	CLX	44		
RTN	24		RCL 6	34 06	off: $b_{yx} = Q_{yx} / Q_x$	
LRL	23	Regression $y \rightarrow x$:	-	81	SF1 on: $b_{yx} = Q_{yx} / Q_x$	R5 Σy^2
C	13	Flag 1 off	R/S	84		
F ⁻¹	32		X	71	off: $a_{yx} = \bar{y} - b_{yx}\bar{x}$	
SF1	51		-	51	SF1 on: $a_{yx} = \bar{y} - b_{yx}\bar{x}$	R6 Q_y
GTO	22		E	15		
E	15		RCL 7	34 07		
RTN	24		F	31		R7 Q_x
LRL	23	Regression $x \rightarrow y$:	TFI	61		
D	14	Flag 1 on	CLX	44		
F	31		RCL 6	34 06		R8 Q_{xy}
SF1	51		F	31		
LRL	23		TX'	09	off: $S_{yx} = S_{xy} / \sqrt{Q_x}$	
E	15		-	81	SF1 on: $S_{yx} = S_{xy} / \sqrt{Q_x}$	R9 Σxy
RCL 6	34 06		R/S	84		
RCL 7	34 07		$\Sigma x \Sigma y$	35 07	SF1 off: a_{yx}	
F	31		R/S	84	on: a_{yx}	
TFI	61		$\Sigma x \Sigma y$	35 07		LABELS
$\Sigma x \Sigma y$	35 07		RCL 3	34 03		A $\bar{x}$
Σx^2	35 01		F	31		B $\bar{y}$
RCL 8	34 08		TFI	61		C Reg: $y \rightarrow x$
F ⁻¹	32		CLX	44		D $x \rightarrow y$
TX'	09		RCL 5	34 05		E S_{yx}, S_{xy}
$\Sigma x \Sigma y$	35 07		RCL 1	34 01		0
-	81		-	81		1
-	51		F	31		2
RCL 1	34 01		TX'	09	off: $S_{yx} = S_{xy} \cdot \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n}}$	3
2	02		X	71	SF1 on: $S_{yx} = S_{xy} \cdot \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n}}$	4
-	51		RTN	24		5
-	81	off: $S_{yx} = \sqrt{\frac{Q_y - Q_{yx}^2}{n - 2}}$				6
F	31					7
TX'	09	SF1 on: $S_{xy} = \frac{Q_{xy} - Q_{yx}Q_{yx}/Q_x}{n - 2}$				8
RTN	24					9
GLTX	35 00	SF1 off: S_{yx}^2				FLAGS
R/S	84	on: S_{xy}^2				1 off: $y \rightarrow x$
$\Sigma x \Sigma y$	35 07					on: $x \rightarrow y$
2	02					2
X	71	SF1 off: $2 S_{yx}$				
R/S	84	on: $2 S_{xy}$				

Programmer Korrelation Date Nov. 74

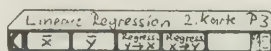


STEP	INSTRUCTIONS	INPUT DATA/UNITS	KEYS	OUTPUT DATA/UNITS
1	1. Programmkarte einlesen		[] []	
2	Eingabe: 1. Wertepaar	x_i	A []	x_i
		y_i	R/S []	i
	nächstes Wertepaar	x_{i+1}	A []	x_{i+1}
		y_{i+1}	R/S []	$i+1$
	usw. bis n.Wertepaar		[] []	n
2a	Bei Eingabe eines falschen Wertepaares kann dieses an beliebiger Stelle zum Löschen eingegeben werden.	x_{falsch}	E []	x_{falsch}
		y_{falsch}	R/S []	$i-1$
3	Ist Eingabe beendet, lies Anzahl der Wertepaare:		[] []	n
4	Ergebnisse: Korrelationskoeffizient u.seine Standardabw.		[] []	r
			[] []	s_r
5	Falls gewünscht: Summe der Abweichungsprodukte Summen der Abweichungsqadrate		[] [] RCL 8 RCL 7 RCL 6	$\sum x y$ $\sum x^2$ $\sum y^2$
	Weiter mit der 2.Programmkarte		[] [] [] [] [] [] [] [] [] [] [] []	

HP-65 User Instructions

Title Lineare Regression, Parameter der Regressions- Page 2 of 3

Programmer geraden für y → x, bzw. x → y Date Nov. 74



STEP	INSTRUCTIONS	INPUT DATA/UNITS	KEYS	OUTPUT DATA/UNITS
6	2. Programmkarte einlesen		C D	
7	Ergebnisse: Mittelwert aller x_i		A R/S	$\bar{x}$
8	" " y_i		B R/S	$\bar{y}$
	Für d. Regress. $y \rightarrow x$		C D	
9	Standardabw. der $\hat{y}$ -Werte		C D	$\pm s_{y \cdot x}$
10	Restvarianz "		R/S D	$s^2_{y \cdot x}$
11	zweif. Standardabw. der $\hat{y}$ -Werte		R/S D	$\pm 2s_{y \cdot x}$
12	Regressionskoeffizient		R/S D	b_{yx}
13	u. seine Standardabweichung		R/S D	$\pm s_{b_{yx}}$
14	Ordinatenschnittpunkt		R/S D	a_{yx}
15	u. seine Standardabweichung		R/S D	$\pm s_{a_{yx}}$
	Für d. Regress. $x \rightarrow y$		C D	
16	Standardabweichung der $\hat{x}$ -Werte		D D	$\pm s_{x \cdot y}$
17	Restvarianz "		R/S D	$s^2_{x \cdot y}$
18	zweif. Standardabw. "		R/S D	$\pm 2s_{x \cdot y}$
19	Regressionskoeffizient		R/S D	b_{xy}
20	u. seine Standardabweichung		R/S D	$\pm s_{b_{xy}}$
21	Ordinatenabschnitt		R/S D	a_{xy}
22	u. seine Standardabweichung		R/S D	$\pm s_{a_{xy}}$
23	Sollen einige Wertepaare hinzugefügt oder abgezogen werden: +STEP 1. Grundsummen bleiben von der 2. Karte unbeeinflusst.		C D C D C D	
24	Für eine neue Regressionsanalyse		C D	
	entweder		f REG	
	oder		off on	
	dann wieder zu STEP 1 gehen.		C D	

Beispiel zu P 3

Versuch Nr. 74 II, ABS-Aufnahme, Mg-arme Zellen, 11.9.72

Inkubationszeit(min), $(S)_i$ in $\mu\text{mol/l}$ $((S)_e \approx 0.1 \text{ mmol/l})$

5.2, 6.54461
 5.2, 9.06352
 10, 17.7548
 10, 23.7445
 10, 19.1018
 20, 45.5923
 20, 39.6167
 20, 34.7824
 30.1, 47.5139
 30.1, 49.0064
 30.1, 47.6079

Nach Programm-Bedienungsanleitung eingeben.

Ergebnisse:

$n = 11$

$r \pm s_r = 0.958103 \pm 0.095474$

$\bar{x} = 17.3364 \text{ min}$

$\bar{y} = 30.939 \mu\text{mol/l}$

$Q_x = 966.065$

Regr. $y \rightarrow x$

$s_{y.x} = 4.88985 \mu\text{mol/l}$

$2s_{y.x} = 9.77970 "$

$s_{y.x}^2 = 23.9106 (\mu\text{mol/l})^2$

$b_{yx} \pm s_{b_{yx}} = 1.57877 \pm 0.15732 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}} (= v_{in})$

$a_{yx} \pm s_{a_{yx}} = 3.56884 \pm 3.10040 \mu\text{mol/l}$

Falls gewünscht: Regr. $x \rightarrow y$

$s_{x.y} = 2.96749 \text{ min}$

$2s_{x.y} = 5.93498 "$

$s_{x.y}^2 = 8.80599 \text{ min}^2$

$b_{xy} \pm s_{b_{xy}} = 0.581441 \pm 0.057940 \frac{\text{min} \cdot \text{l}}{\mu\text{mol}}$

$a_{xy} \pm s_{a_{xy}} = -0.652835 \pm 2.003493 \text{ min}$

HP-65 Program Form

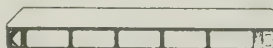
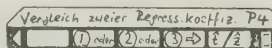
Title Vergleich zweier Regressionskoeffizienten Page 1 of 4

SWITCH TO W-PRGM PRESS [1] PRGM | TO CLEAR MEMORY

KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	KEY ENTRY	CODE SHOWN	COMMENTS	REGISTERS
R/S	84	Werte eingabe in die Register	+	61		R1 $\frac{S}{S_x}$
-	51		x	71		S_y
9	35		f	31		
ABS	06		TX	09		R2 $\frac{S_y}{S_x}$
STO 8	3108	$ \Delta b = b_{y,x_1} - b_{y,x_2} $	STO 6	06	S_D (Formel s. S. 19)	$\frac{S_y}{S_x}$
2	02		RTN	24		R3 n_1
STO	33		LBL	23		v_1
-	51		C	13	S_D bei $G_1^2 \neq G_2^2$ und $n > 20$	R4 n_2
3	03	$v_1 = n_1 - 2$	RCL 1	3401		v_2
2	02		RCL 5	3405		R5 Q_{x_1}
STO	33		$\div$	81		
-	51		STO 7	3107	$K = \frac{S_y^2 \cdot x_1}{Q_{x_1}}$	
4	04	$v_2 = n_2 - 2$	RCL 2	3402		
0	00		RCL 6	3406		
R/S	84	Eing F(4; v ₁ ; v ₂ ; 0.10) aus eine Tabelle	$\div$	81		
RCL 1	3401		+	61		R6 Q_{x_2}
RCL 2	3402		STO 1	3301	S_D^2	S_{D1}^2, S_{D2}^2
-	81		f	31		
R/S	84		TX	09		R7 b_{y,x_1}
9x=y	3522		STO 6	3306	S_D (Formel s. S. 19)	k_1
1	01	bei (1) drücke A	RTN	24		
R/S	84		LBL	23	S_D bei $G_1^2 \neq G_2^2$ und $n < 20$	R8 b_{y,x_2}
1	01		D	14		$ \Delta b $
8	08		B	13		
RCL 3	3403		R/S	84		R9
9x>y	3524		RCL 7	3407		
2	02	bei (2) drücke B	RCL 1	3401		
R/S	84		$\div$	81		
3	03	bei (3) drücke C	STO 2	3302	$c = K / S_D^2$	LABELS
R/S	84		F ⁻¹	32		A ① S_D, v
LBL	23	S_D bei $G_1^2 = G_2^2$	TX	09		B ② S_D
B	12		RCL 3	3403		C ③ S_y, v'
RCL 1	3401		$\div$	81		D ④ b_{y,x_1}
RCL 3	3403		1	01		E ⑤ $\frac{S}{S_x}$
x	71		RCL 2	3402		0
RCL 2	3402		-	51		1
RCL 4	3404		F ⁻¹	32		2
x	71		TX	09		3
+	61		RCL 4	3404		4
RCL 3	3403		$\div$	81		5
RCL 4	3404		+	61		6
+	61	$v = n_1 + n_2 - 4$	9	35		7
R/S	84		1/x	04	v (Formel s. S. 19)	8
$\div$	81		RTN	24		9
RCL 5	3405		LBL	23		FLAGS
9	35		E	15		1
1/x	04		RCL 8	3408		
RCL 6	3406		RCL 6	3406		2
9	35		$\div$	81	$t = b_1 - b_2 / S_D$	
1/x	04		RTN	24		

HP-65 User Instructions

Title Vergleich zweier Regressionskoeffizienten Page 1 of 4
 Programmer _____ Date Nov. 74



STEP	INSTRUCTIONS	INPUT DATA/UNITS	KEYS	OUTPUT DATA/UNITS
1	Programmkarte einlesen			
2	Programm starten		RTN R/S	
3	Eingabe: von Stichprobe 1	$s_{y_1 \cdot x_1}^2$	STO 1	$s_{y_1 \cdot x_1}^2$
	" 2	$s_{y_2 \cdot x_2}^2$	STO 2	$s_{y_2 \cdot x_2}^2$
	" 1	n_1	STO 3	n_1
	" 2	n_2	STO 4	n_2
	" 1	Q_{x_1}	STO 5	Q_{x_1}
	" 2	Q_{x_2}	STO 6	Q_{x_2}
	" 1	$b_{y_1 x_1}$	STO 7	$b_{y_1 x_1}$
	" 2	$b_{y_2 x_2}$	STO 8	$b_{y_2 x_2}$
4	Errechnung von v_1 und v_2		R/S	0.00
5	Eing. $F(n-2; n-2; 0.01)$ aus F-Tab.	$F()$	R/S	$\hat{F}$
6	Formelwahl für Studentttest:		R/S	1
	oder			2
	oder			3
7a	Bei 1 (= 1. auf S. 19): $s_1^2 = s_2^2$		B	v
			R/S	s_D
7b	Bei 2 (= 2.a. auf S. 19): $s_1^2 \neq s_2^2, n > 20$		C	s_D
7c	Bei 3 (= 2.b. auf S. 19): " , $n < 20$		D	s_D
			R/S	v
8a	Für 7a und 7c:		E	$\hat{t}$
8b	Für 7b:		E	$\hat{z}$
9	Beurteilung siehe S. 19 u. 20			
10	Absolute Diff.d.beiden Regress.koeff.		RCL 8	$ \Delta b $
11	Für neuen Vergleich gehe zu STEP 2			

Beispiel zu P.4

Vergleich der Aufnahmegeschwindigkeit von MGP bei normal und magnesiumarm gewachsenen Yoshida-Tumorzellen.
(Versuch Nr. 44, 24.2.72)

Vergleichsparameter: Mg-arm, normal

$$\begin{aligned} s_{y.x}^2 &: 664.434, 565.470 \\ n &: 13, 17 \\ Q_x &: 1336, 1455.88 \\ b_{yx} &: 6.67605, 5.19563 \quad \mu\text{mol}/(1\cdot\text{min}) = v_{\text{in}} \end{aligned}$$

Nach Programm-Bedienungsanleitung eingeben.

Anzeige: 0, dh. Vorrechnung beendet.

$F(11,15,0.10)$ aus F-Verteilungstab. = 2.04 eingeben:

Anzeige: $\hat{F} = 1.17501$

Formelwahl ergibt Anzeige 1, dh. beide Restvarianzen gleich, also Taste B drücken:

$v = 26,$

$$\hat{t}_P = \frac{|\Delta b|}{s_D} = \frac{1.48042}{0.93368} = 1.58558$$

$t(26,0.05)$ aus Student-Verteilungstab. = 2.056 (zweiseitige Fragestellung, s.S.20)

d.h.: $\hat{t}_P < t_{\alpha_G} \hat{=} P > \alpha$, also, da Nullhypothese auf dem 5 %-Niveau nicht abgelehnt, ist kein signifikanter Unterschied zwischen $v_{\text{in,Mg-arm}}$ und $v_{\text{in,normal}}$ im Versuch Nr. 44 festgestellt worden.

Für tatkräftige Hilfeleistung danke ich den technischen Mitarbeitern im Forschungslabor von Priv.-Doz.Dr.R. Averdunk: Frl. Wagner, Frau Leopold, Frau Stift und besonders Herrn Quandt. Die Professoren und wiss. Assistenten des Inst.für Klin. Chemie und Biochemie haben mich mit ihren fachlichen Hinweisen sehr gefördert. Die Herren Dipl.-Ing. W. Lange und Dipl.-Ing. G. Maigatter haben mich in die Anfänge des Programmierens mit viel Geduld eingewiesen und mir auch bei später auftauchenden Fragen mit Rat und Tat geholfen.

Herrn Priv.-Doz.Dr.med. R. Averdunk möchte ich besonders für seine jederzeit großzügige Unterstützung und Einweisung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Meiner Frau Astrid danke ich für die Korrektur des Manuskriptes und vor allem für ihre während dieser Arbeit oft in Anspruch genommene Langmut.

LEBENS LAUF

- 23.10.1947 Geboren in Berlin. Meine Eltern sind
Dr.med.Georg und Dr.med.Hildegard Ostapowicz.
- 1954 - 58 Evang. Grundschule in Bln.-Charlottenburg.
- 1958 - 67 Evang. Gymn. zum Grauen Kloster in Berlin.
21. 2. 1967 Abitur an diesem Gymnasium.
- SS 1967 Immatrikulation für Humanmedizin an der
FU Berlin.
- 18.3.1968 Vorphysikum, FU Berlin.
- 10.10.1969 Physikum. FU Berlin.
- 9.8.1973 Staatsexamen für Humanmedizin an der FU Berlin.
- 22.4.1972 Heirat mit meiner Frau Astrid, geb.Brecko und
- 26.12.1973 Geburt unserer Tochter Tanja.
- Sept.-Dez.1973 Med.Ass., Inn.Med.im Klinikum Westend.
- Jan.-Apr.1974 Med.Ass., Ins. für Klinische Chemie und Bio-
chemie; Beendigung des praktischen Teils
dieser Dissertation.
- Mai - Aug.1974 Med.Ass. in der Chirurg. Abt. des Städtischen
Krankenhauses Salzgitter-Lebenstedt.
- 24.9.1974 Approbation als Arzt durch den Berliner
Senator für Gesundheit und Umweltschutz.
- 1.11.1974 Beginn meiner jetzigen Tätigkeit als Assistenz-
arzt im Zentrallabor des Städt.Auguste-
Viktoria-Krankenhauses, Berlin-Schöneberg.

